

# **EFEITO DO QUITOSANO EM LEVEDURAS DE ALTERAÇÃO DE VINHOS**

**Janine Machado Gomes**

Dissertação para obtenção do Grau Mestre em  
**Engenharia Alimentar – Processamento de Alimentos**

Orientador: Professor Doutor Manuel Malfeito Ferreira

Coorientador: Mestre Sofia Fernandes Camilo

**Juri:**

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora auxiliar com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar do Departamento de Botânica e Engenharia Biológica do ISA

Doutora Helena Maria Frazão Rodrigues de Sousa, Professora auxiliar com agregação da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todos que de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho. Correndo o risco de me esquecer de alguns nomes, todos estão presentes na minha memória. Assim, não poderei deixar de referir algumas pessoas que tiveram um papel decisivo ao longo desta etapa.

Ao meu Professor Manuel Malfeito que aceitou ser o meu orientador nesta caminhada e por todos os ensinamentos que me foi transmitindo. Agradeço a oportunidade e o privilégio de ter trabalhado sob sua orientação, bem como a confiança que em mim depositou. A sua boa disposição e os almoços acompanhados sempre por uma boa companhia, ficarão gravados nas minhas lembranças.

À Sofia, minha coorientadora e amiga, pela sua presença constante e pela força que me foi transmitindo no desenrolar de todo este processo. Pelo seu conhecimento, pela sua infindável paciência e sobretudo pela persistência que sempre teve, quando todos os dias me perguntava “Já leste os artigos? Já começaste a escrever?”. Ao Miguel Fernandes que me apresentou ao laboratório e possibilitou que *o tratasse por tu*, bem como às técnicas e procedimentos laboratoriais. Por todo o acompanhamento na fase inicial, o meu muito obrigado. Ao Miguel Abreu pela sua recetividade aos meus constantes pedidos e consequentes resultados, que foram fundamentais neste trabalho.

À Carla pela sua constante disponibilidade. À Dona Manuela pela atenção que sempre dispensou ao nosso laboratório, assegurando as condições para que pudéssemos trabalhar. Pela sua presença, que ainda que discreta, fazia companhia e o tempo passava sem que dessemos por ele. À Dona Lena pela sua alegria e bom humor. À Inês que me acompanhou nestes últimos dias de árduo trabalho. Um agradecimento ainda, a todas as pessoas que fazem parte da equipa do laboratório de microbiologia do ISA.

À minha família, em especial aos meus pais pela minha formação, a quem tudo devo. À minha prima Liliana, que foi determinante na revisão dos resultados do meu trabalho e pela dedicação que demonstrou. Ao meu Miguel, que me aturou ao longo deste caminho, suportando-me nos momentos mais difíceis.

## RESUMO

O quitosano é utilizado como um agente antimicrobiano na indústria do vinho. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o seu efeito inibidor em três espécies de leveduras de alteração de vinhos: *Brettanomyces bruxellensis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Zygosaccharomyces bailii*. Os resultados mostraram um aumento da inibição do crescimento com teores crescentes de quitosano (No Brett Inside®). No entanto, apesar da concentração máxima testada de 1 g.L<sup>-1</sup> ter inibido o crescimento de *S. cerevisiae*, não induziu morte celular. Em relação a *B. bruxellensis* e *Z. bailii* foi possível determinar uma concentração mínima letal de 0,5 e 0,1 g.L<sup>-1</sup>, respetivamente. Sabendo que a concentração máxima permitida por lei é de 0,1 g.L<sup>-1</sup>, concluiu-se que o quitosano apenas é eficaz contra esta última espécie. Foi testado um quitosano de uma marca diferente (OenoBrett®), cuja eficácia foi semelhante à anterior, após o fim do ensaio, nas concentrações de 0,05; 0,1 e 0,5 g.L<sup>-1</sup>, para *Z. bailii*, *B. bruxellensis* e *S. cerevisiae*, respetivamente. Em conjunto verificou-se que *B. bruxellensis* na presença de 0,1 g.L<sup>-1</sup> de quitosano OenoBrett® não produziu fenóis voláteis, provavelmente devido à ausência de crescimento durante o período do ensaio.

**Palavras-chave:** quitosano, vinho, *B. bruxellensis*, *S. cerevisiae*, *Z. bailii*, concentração mínima letal

## ABSTRACT

Chitosan has been known for its antimicrobial activity, particularly in wine industry. The purpose of this study was to investigate the effect of chitosan against three different species of spoilage yeasts in wine: *Brettanomyces bruxellensis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*. The results showed that increasing levels of chitosan (No Brett Inside®) enhance the inhibitory effect. However, despite of the highest concentration tested of 1 g.L<sup>-1</sup> had an inhibitory effect on *S. cerevisiae* growth, it did not induce cell death. On the other hand, it was possible to determine minimum lethal concentration of 0,5 and 0,1 g.L<sup>-1</sup>, for *B. bruxellensis* and *Z. bailii*, respectively. Knowing that the maximum concentration allowed by law is of 0,1 g.L<sup>-1</sup>, it was concluded that chitosan is only effective against this latter specie. Additionally, another brand of chitosan (OenoBrett®) was tested which efficacy was similar to the previous one, after the end of the study, at concentrations of 0,05; 0,1 and 0,5 g.L<sup>-1</sup>, for *Z. bailii*, *B. bruxellensis* e *S. cerevisiae*, respectively. The production of 4-ethylphenol of *B. bruxellensis* with 0,1 g.L<sup>-1</sup> of OenoBrett® chitosan was also evaluated and it was concluded that this specie did not produce volatile phenols, probably due to the absence of growth during the testing period.

**Keywords:** chitosan, wine, *B. bruxellensis*, *S. cerevisiae*, *Z. bailii*, minimum lethal concentration

## EXTENDED ABSTRACT

Yeasts are responsible for alcoholic fermentation in wine. However they can have a detrimental role, considering they may adversely affect wines' smell and flavour. Yeast spoilage is a major concern throughout the wine industry. To produce consistent, high-quality wine is vital to know the characteristics of yeast spoilage, as well as the available control technologies. *Saccharomyces cerevisiae* has a leading role in alcoholic fermentation. However, some strains of *S. cerevisiae* can be associated with re-fermentation of bottled red wines. On the other hand, species like *Brettanomyces bruxellensis* and *Zygosaccharomyces bailii* are the most significant threats for wine makers. Both yeasts have exceptional tolerance to ethanol and a variety of common preservatives. *B. bruxellensis* is responsible for the production of volatile phenols, causing bad flavours such as "horse sweat" taste and "mousy" taint in contaminated wine. Meanwhile, *Z. bailii* is responsible for the excessive gas formation and turbidity in bottled wines.

In order, to reduce microbial spoilage during wine processing, adherence to proper sanitation protocols throughout the winemaking process is essential. Despite sanitation protocols being critical, winemakers must also balance the application of antimicrobial technologies with maintaining wine quality. To minimize any detrimental impact on quality, a variety of traditional and emerging antimicrobial technologies exist. The most common preservative used in the wine industry is sulphur dioxide because of its antioxidant and antimicrobial properties. Similar to SO<sub>2</sub>, dimethyldicarbonate (DMDC) is added to must and wine to inactivate spoilage microorganisms. The application of chitosan as an antimicrobial technology in wineries is relatively recent. Chitosan is a natural polymer obtained by deacetylation of chitin. Unique among most polysaccharides, chitosan is biodegradable, environmentally nontoxic and antimicrobial to many yeasts. Antimicrobial activity of this molecule depends on the molecular weight, the deacetylation degree and the medium pH. Chitosan used in wine is from fungal origin, extracted from the fungus *Aspergillus niger*. The maximum concentration that can be applied is 0,1 g.L<sup>-1</sup>. Its capacity to limit growth of both *Z. bailii* and *B. bruxellensis* has attracted much attention as an alternative to SO<sub>2</sub>. However, the literature showing its effect in yeasts of this genus is limited.

The characteristics of chitosan and its effect in wine spoilage yeasts were studied against three species: *Brettanomyces bruxellensis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*. The results showed that increasing levels of chitosan (No Brett Inside®) enhance the inhibitory effect. However, despite of the highest concentration tested of 1 g.L<sup>-1</sup> had an inhibitory effect on *S. cerevisiae*, it did not induce cell death. On the other hand, it was possible to determine minimum lethal concentration of 0,5 and 0,1 g.L<sup>-1</sup>, for *B.*

*bruxellensis* and *Z. bailii*, respectively. Knowing that the maximum concentration allowed by law is of 0,1 g.L<sup>-1</sup>, it was concluded that chitosan is only effective against this latter specie. Additionally, another brand of chitosan (OenoBrett®) was tested which efficacy was similar to the previous one, after the end of the study, at concentrations of 0,05; 0,1 and 0,5 g.L<sup>-1</sup>, for *Z. bailii*, *B. bruxellensis* e *S. cerevisiae*, respectively. The production of 4-ethylphenol of *B. bruxellensis* with 0,1 g.L<sup>-1</sup> of OenoBrett® chitosan was also evaluated and it was concluded that this specie did not produce volatile phenols, probably due to the absence of growth during the testing period.

## ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS .....	ii
RESUMO .....	iii
ABSTRACT .....	iv
EXTENDED ABSTRACT .....	v
ÍNDICE GERAL .....	vii
ÍNDICE DE TABELAS .....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS .....	x
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xi
1. Introdução .....	1
1.1. Processo de vinificação .....	2
1.2. Consórcio microbiano do vinho.....	3
1.2.1. Bactérias lácticas.....	3
1.2.2. Leveduras .....	4
1.3. Leveduras do género <i>Brettanomyces/Dekkera</i> .....	5
1.4. Leveduras do género <i>Saccharomyces</i> .....	8
1.5. Leveduras do género <i>Zygosaccharomyces</i> .....	8
1.6. Controlo do crescimento microbiano no vinho .....	9
1.6.1. Dióxido de enxofre.....	10
1.6.2. Dimetildicarbonato .....	10
1.6.3. Ácido Sórbico.....	11
1.6.4. Quitosano .....	11
1.7. Enquadramento e Objetivos .....	16
2. Materiais e Métodos .....	17
2.1. Leveduras utilizadas .....	18
2.2. Preparação do vinho.....	18
2.3. Preparação do inóculo em meio GYP líquido .....	18
2.4. Ensaio em vinho .....	19
2.5. Ensaio em vinho com adição de quitosano de origem fúngica.....	19
2.6. Ensaio em vinho com adição de quitosano e enzimas (pectinases e glucanases) ....	20
2.7. Determinação de fenóis voláteis.....	20
2.7.1. Extração de 4-vinilfenol e 4-etilfenol .....	20
2.7.2. Análise cromatográfica .....	21
2.7.3. Quantificação do 4-etilfenol.....	21

3. Resultados e Discussão .....	22
3.1. Estudo do efeito do quitosano No Brett Inside® na viabilidade de leveduras de vinhos .....	23
3.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	23
3.1.2. <i>Zygosaccharomyces bailii</i> .....	24
3.1.3. <i>Brettanomyces bruxellensis</i> .....	25
3.1.4. Concentração mínima letal .....	27
3.2. Estudo do efeito do quitosano OenoBrett® na viabilidade de leveduras de vinhos ...	27
4. Conclusão .....	30
5. Referências Bibliográficas .....	32



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 Classificação das leveduras do vinho (adaptado de Delanoe <i>et al.</i> , 2005 e Vincenzini <i>et al.</i> , 2005). .....	5
Tabela 1.2 Conservantes utilizados em leveduras de alteração de vinhos (adaptado de Fugelsang e Edwards 2007a e Zuehlke <i>et al.</i> , 2013). .....	9
Tabela 1.3 Limite de aplicação de conservantes no vinho. ....	13
Tabela 1.4 Mecanismos de ação do quitosano. ....	15
Tabela 3.1 Vitalidade celular de cada estirpe de levedura para o último dia do ensaio. ....	27
Tabela 3.2 Concentração mínima letal para o quitosano No Brett Inside® nas três estirpes de leveduras. ....	27

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Observação microscópica de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> (x400). ....	6
Figura 1.2 Formação de 4-etilfenol e 4-etilguaiacol (adaptado de Suárez <i>et al.</i> , 2007).....	7
Figura 1.3 Observação microscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (x400).....	8
Figura 1.4 Observação microscópica de <i>Zygosaccharomyces bailii</i> (x400). ....	9
Figura 1.5 Moléculas de quitina e quitosano (adaptado de Pillet, 2010). ....	12
Figura 1.6 Células de <i>Staphylococcus simulans</i> 22 no microscópio electrónico de transmissão. Controlo (a); tratamento com 10x CMI de quitosano durante 5 minutos (b); durante 20 minutos (c) e durante 60 minutos (d). As aproximações mostram células individualizadas (adaptado de Raafat <i>et al.</i> , 2008). ....	14
Figura 1.7 Observação microscópica de quitosano e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> no vinho (x400).....	15
Figura 2.1 Preparação do inóculo.....	18
Figura 2.2 Curva de calibração de 4-etilfenol no GC .....	21
Figura 3.1 Comportamento da estirpe <i>S. cerevisiae</i> ISA 1083 com diferentes concentrações de quitosano.....	24
Figura 3.2 Comportamento da estirpe <i>Z. bailii</i> ISA 2419 com diferentes concentrações de quitosano.....	25
Figura 3.3 Comportamento da estirpe <i>B. bruxellensis</i> ISA 2202 com diferentes concentrações de quitosano.....	26
Figura 3.4 Efeito dos dois tipos de quitosano No Brett Inside® e OenoBrett® na concentração de 0,05 g.L <sup>-1</sup> na viabilidade de <i>Z. bailii</i> . ....	28
Figura 3.5 Efeito dos dois tipos de quitosano No Brett Inside® e OenoBrett® na concentração de 0,5 g.L <sup>-1</sup> na viabilidade de <i>S. cerevisiae</i> . ....	29
Figura 3.6 Efeito dos dois tipos de quitosano No Brett Inside® e OenoBrett® na concentração de 0,1 g.L <sup>-1</sup> na viabilidade de <i>B. bruxellensis</i> e na produção de 4-etilfenol. ...	29

## LISTA DE ABREVIATURAS

4-EF	4-Etilfenol
DMDC	Dimetildicarbonato
CG	Cromatografia Gasosa
CMI	Concentração Mínima Inibitória
GYP	<i>Glucose Yeast Peptone</i>
OIV	<i>Organisation Internationale de la Vigne eu du Vin</i>
SO <sub>2</sub>	Dióxido de enxofre
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
VBNC	<i>Viable But Non Culturable</i>

# 1. Introdução

### 1.1. Processo de vinificação

O vinho é um produto único que resulta das interações complexas entre fungos filamentosos, bactérias e leveduras, desde a vinha até ao armazenamento, passando pelo processo de fermentação (Fleet, 2003). Esta bebida, é um produto natural, fruto de reações bioquímicas, que se iniciam durante a maturação da uva e se estendem até ao engarrafamento (Romano *et al.*, 2003).

A diversidade e qualidade dos vinhos resultam do tipo de uva, da qualidade do solo, da localização, do clima e das diferentes técnicas utilizadas ao longo do processo de vinificação (Kunkee e Bisson, 1993; Christaki e Tzia, 2002).

Os processos mais importantes na produção de vinho são a fermentação alcoólica, conduzida pelas leveduras, e a fermentação malolática, conduzida pelas bactérias lácticas (Genisheva *et al.*, 2014). Durante a fermentação alcoólica os açúcares do mosto de uva, nomeadamente a glucose e a frutose, são transformados, maioritariamente, em etanol, glicerol e dióxido de carbono (Aranda *et al.*, 2005). A fermentação malolática, atua como uma segunda fermentação, que reduz a acidez e leva a uma maior estabilidade a nível biológico dos vinhos, para além de aumentar as características organolépticas deste produto (Lonvaud-Funel, 1999; Versari *et al.*, 1999; Fugelsang e Edwards, 2007; Lerm *et al.*, 2010). A fermentação malolática resulta da descarboxilação de ácido málico em ácido láctico e é, normalmente, conduzida pela bactéria *Oenococcus oeni* (Bauer e Dicks, 2004).

Por outro lado, a optimização do controlo do processo de fermentação alcoólica na produção de vinho é um grande desafio. Ao contrário de outras fermentações, não é necessário maximizar a concentração ou o rendimento de um determinado metabolito. Neste processo, o principal objectivo é optimizar a qualidade do produto final, o que é muito difícil de quantificar. A degustação do vinho continua a ser a melhor forma de avaliar as suas características, contudo é difícil, impreciso e demorado (Sablayrolles, 2009). Desta forma, existem determinados parâmetros que podem ser controlados, de maneira a melhorar a fermentação: a estirpe de levedura utilizada, o impacto da própria estirpe de levedura na fermentação e no vinho, a adição de nutrientes, a quantidade de azoto amoniacal e de oxigénio e a temperatura (Bardi, 2005; Fugelsang e Edwards, 2007b; Sablayrolles, 2009).

## 1.2. Consórcio microbiano do vinho

A contaminação dos alimentos representa um verdadeiro problema para a indústria alimentar, levando a graves perdas económicas (Loureiro e Querol, 1999). A contaminação resulta normalmente da atividade microbiana e depende fundamentalmente da composição dos produtos e das condições de armazenamento (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 1993).

A contaminação microbiana do vinho pode ocorrer em várias fases do processo de vinificação (Lonvaud-Funel *et al.*, 2010a). As alterações que advêm da contaminação microbiana são provocadas pelo desenvolvimento de leveduras e bactérias, afectando o aroma e sabor do vinho (Comi *et al.*, 2005). Atualmente, as leveduras são consideradas as contaminantes mais preocupantes (Deak e Beuchat, 1996). Existem muitas espécies de leveduras com impacto na qualidade do vinho, podendo este ser positivo ou negativo (Renouf *et al.*, 2007). Assim, as principais leveduras de alteração do vinho são as pertencentes aos géneros *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces* e *Zygosaccharomyces* (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003). Os efeitos comuns de contaminação são a formação de filmes nos vinhos armazenados, turvação, produção de sedimentos e gases em vinhos engarrafados e aparecimento de odores e aromas estranhos (Toit e Pretorius, 2000; Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003).

*Sacharomyces cerevisiae* é a levedura dominante ao longo do processo de fermentação e só é associada a levedura de contaminação quando existe uma re-fermentação em vinhos engarrafados (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Enrique *et al.*, 2007; Rodriguez *et al.*, 2013).

### 1.2.1. Bactérias lácticas

As bactérias lácticas compreendem um vasto grupo de bactérias Gram positivas, catalase e oxidase negativas, sendo também não esporuladas (Rodas *et al.*, 2003). Estas bactérias podem surgir nas uvas ou desenvolver-se na própria adega (Lonvaud-Funel, 1999). Como referido anteriormente, as bactérias lácticas são responsáveis pela fermentação maloláctica. No início desta fermentação a população de bactérias lácticas é cerca de  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> (Lonvaud-Funel, 1999; Versari *et al.*, 1999). Tanto no mosto de uva como no vinho podem ser isolados quatro géneros distintos: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Oenococcus* (Fugelsang e Edwards, 2007c). As bactérias fazem parte da microbiota do vinho e acompanham geralmente todo o processo de fermentação, até ao armazenamento (Muñoz *et al.*, 2005; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). A capacidade destas bactérias crescerem no vinho depois da fermentação alcoólica, depende do pH do vinho, da concentração de etanol, da concentração de dióxido de enxofre e da sua interação com as leveduras do vinho (Lerm *et al.*, 2010). A temperatura de armazenamento do vinho depois da fermentação

alcoólica, também é um factor de grande importância, pois vai determinar o início da fermentação malolática (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983). No final da fermentação malolática, as bactérias lácticas remanescentes continuam a sintetizar os açúcares residuais e a produzir metabolitos secundários, o que pode resultar na contaminação do vinho (Fugelsang e Edwards, 2007d). Em vinhos com pH elevado, podem surgir contaminações por parte de *Lactobacillus* e *Pediococcus*, modificando o aroma e as características finais do vinho (Lonvaud-Funel, 1999; Lerm *et al.*, 2010). O metabolismo das bactérias lácticas no vinho resulta da conversão do ácido L-málico em ácido L-láctico e dióxido de carbono (Drici-Cachon *et al.*, 1996; Versari *et al.*, 1999; Muñoz *et al.*, 2005). Uma vez que o ácido málico seja todo degradado, as bactérias lácticas são normalmente eliminadas através da adição de sulfuroso (Lonvaud-Funel, 1999). A espécie *Oenococcus oeni* é a que apresenta maior tolerância a pH baixo, altas concentrações de dióxido de enxofre e ao teor de álcool no vinho (Drici-Cachon *et al.*, 1996; Lonvaud-Funel, 1999).

Para além de poderem alterar as características organolépticas e sensoriais do vinho, as bactérias lácticas podem também produzir compostos prejudiciais para a saúde humana, tais como aminas biogénicas e carbamato de etilo (Lerm *et al.*, 2010). As aminas biogénicas são produzidas por certas bactérias lácticas, principalmente *Pediococcus* e *Lactobacillus*, através da descarboxilação de aminoácidos naturalmente presentes no vinho (Shalaby, 1997; Moreno-Arribas *et al.*, 2003; Lerm *et al.*, 2010). Por outro lado, o carbamato de etilo tem origem no catabolismo da arginina, sendo os principais responsáveis *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus hilgardii* e *Lactobacillus plantarum* (Uthurry *et al.*, 2006).

### 1.2.2. Leveduras

No processo de vinificação, intervêm diversas leveduras, responsáveis pela fermentação alcoólica (Tabela 1.1) (Torija *et al.*, 2001). Durante a fermentação, a população viável de leveduras no mosto aumenta de  $10^4 - 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> para  $10^8 - 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Este crescimento segue um padrão comum caracterizado por quatro fases: fase *lag*, fase exponencial, fase estacionária e fase de morte celular ou fase de declínio (Deak e Beuchat, 1996). Este crescimento varia com o tipo de fermentação e é influenciado por vários factores tais como clarificação do mosto, adição de dióxido de enxofre, temperatura de fermentação, composição do mosto, inoculação de determinadas leveduras e interação com outros microrganismos presentes (Fleet e Heard, 1993).

Contudo, estes microrganismos podem representar tanto um papel benéfico, como um papel prejudicial neste processo, uma vez que podem contaminar os vinhos, principalmente durante a fermentação alcoólica e nas etapas de armazenamento na adega e engarrafamento (Fleet e Heard, 1993; Dequin *et al.*, 2003). A qualidade do vinho é afectada pelas leveduras de alteração, que produzem altas quantidades de ácido acético, fenóis

voláteis e outros compostos indesejados (Dequin *et al.*, 2003). Todavia, o conceito de levedura de alteração ou levedura contaminante é ambíguo, pois o que para uns pode afectar sensorialmente o produto final, para outros pode contribuir para a complexidade de um determinado vinho (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003). No caso de bebidas que resultam da fermentação alcoólica, este conceito já é mais complexo, pois é considerada levedura de alteração, qualquer levedura que seja capaz de alterar as características sensoriais do alimento (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Cocolin e Ercolini, 2008).

Tabela 1.1 Classificação das leveduras do vinho (adaptado de Delanoe *et al.*, 2005 e Vincenzini *et al.*, 2005).

Leveduras do vinho		
Géneros	Fermentação	Características morfológicas
<i>Brettanomyces</i>	+	Leveduras com forma de ogiva, alongadas
<i>Candida</i>	+/-	Leveduras de diversas formas: cilíndricas, alongadas, em forma de lua
<i>Hanseniaspora</i>	+	Leveduras apiculadas ou em forma de limão
<i>Pichia</i>	+	Leveduras redondas ou alongadas
<i>Saccharomyces</i>	+	Leveduras com forma elipsoidal
<i>Saccharomycodes</i>	+	Leveduras apiculadas grandes
<i>Schizosaccharomyces</i>	+	Leveduras alongadas
<i>Zygosaccharomyces</i>	+	Leveduras ovóides, elipsoidais ou cilíndricas

### 1.3. Leveduras do género *Brettanomyces/Dekkera*

Entre as muitas leveduras de alteração do vinho, *Brettanomyces* e a sua forma esporulada teleomorfa *Dekkera* (Figura 1.1) constituem um verdadeiro problema para a indústria do vinho (Deak e Beuchat, 1996; Fugelsang e Edwards, 2007). Existem cinco espécies pertencentes ao género *Brettanomyces/Dekkera*: *B. anomala*, *B. bruxellensis*, *B. custersiana*, *B. naardensis* e *B. nanus* (Smith, 2011). A espécie *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* é a mais importante do ponto de vista enológico, tendo sido isolada da uva e do vinho (Mittrakul *et al.*, 1999; Egli e Henick-Kling, 2001). Os produtos do seu metabolismo, como fenóis voláteis, tetrahidropiridina, ácidos gordos e ácido acético, alteram particularmente a qualidade sensorial dos vinhos, mascarando as notas frescas e frutadas apreciadas pelo consumidor (Heresztyn, 1986; Ciani e Ferraro, 1997a; Lonvaud-Funel *et al.*, 2010a). Das suas características metabólicas destacam-se o facto das duas espécies conseguirem assimilar nitratos e algumas *Brettanomyces* serem capazes de utilizar o etanol como fonte de carbono e energia (Lonvaud-Funel *et al.*, 2010a). Estas leveduras são particularmente resistentes ao etanol e ao dióxido de enxofre. Não são muito exigentes do ponto de vista nutricional, adaptando-se bem quer à presença de oxigénio, quer à sua



ausência (Renouf e Lonvaud-Funel, 2007). Na verdade, o seu crescimento é lento e por isso estas leveduras surgem normalmente em vinhos tintos que passam por um período de envelhecimento em barricas de madeira e em vinhos engarrafados (Chatonnet *et al.*, 1992). As barricas de carvalho, por exemplo, onde os vinhos são armazenados durante longos períodos, são um grande foco de contaminação (Ciani e Ferraro, 1997b), pois apesar de conferirem características organolépticas únicas ao vinho, são de difícil higienização, dado o seu caráter poroso (Suárez *et al.*, 2007). Constituem, assim, um ambiente onde leveduras, como *Brettanomyces*, podem sobreviver e ser transferidas de vinho para vinho (Zuehlke *et al.*, 2013). A contaminação por parte desta levedura resulta na turvação do vinho, formação de películas nos vinhos armazenados e na produção de ácido acético e 4-etilfenol (Stratford e James, 2003). *Brettanomyces* é tipicamente pequena e as suas células são em forma de ogiva, que podem apresentar estruturas ramificadas (Suárez *et al.*, 2007; Kheir *et al.*, 2013).



Figura 1.1 Observação microscópica de *Brettanomyces bruxellensis* (x400).

A produção de fenóis voláteis por parte desta levedura é preocupante, uma vez que provocam defeitos a nível sensorial, como aromas a suor de cavalo, cravo, especiarias, medicinal, fumo, rato, entre outros (Comi *et al.*, 2005). Estes compostos voláteis são maioritariamente 4-etilguaiaicol e 4-etilfenol (Lonvaud-Funel *et al.*, 2010a). O 4-etilguaiaicol é responsável pelo odor a cravo e especiarias, enquanto que o 4-etilfenol é atribuído o odor a fumo e medicinal (Fugelsang e Edwards, 2007e). O odor a rato é associado à formação de compostos derivados da tetrahidropiridina (Grbin e Henschke, 2000). Contudo, o impacto desta levedura depende de vinho para vinho e da preferência do enólogo e do consumidor. Segundo Loureiro e Malfeito-Ferreira (2003), existem consumidores que rejeitam vinhos com concentrações superiores a  $620 \mu\text{g.L}^{-1}$  de 4-etilfenol, enquanto outros não. Estes autores acreditam que concentrações inferiores a  $400 \mu\text{g.L}^{-1}$  deste composto contribuem para a complexidade de um vinho. O ácido p-cumárico e ferrúlico são descarboxilados a 4-vinilfenol e 4-vinilguaiaicol pela enzima hidroxicinamato descarboxílase e em seguida, estes compostos são reduzidos a 4-etilfenol e 4-etilguaiaicol por ação da enzima vinilfenol redutase (Figura 1.2) (Manzanares e Vallés, 2005; Fugelsang e Edwards, 2007e; Suárez *et al.*, 2007).

Como a produção de quantidades significativas de 4-etilfenol pertence somente ao género *Brettanomyces*, os produtores de vinho utilizam a medição deste composto como um indicador de contaminação desta levedura no vinho (Fugelsang e Edwards, 2007e).

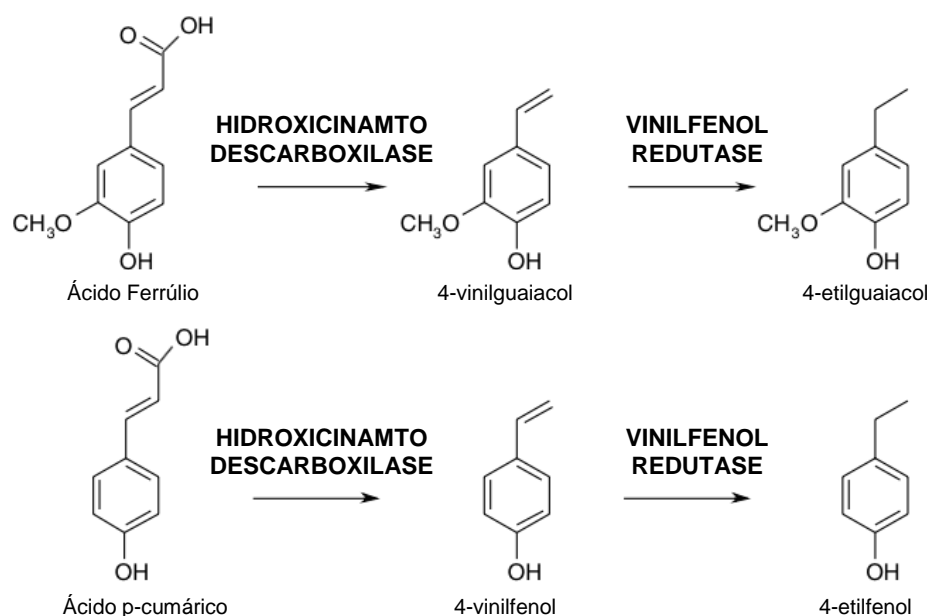


Figura 1.2 Formação de 4-etilfenol e 4-etilguaiaicol (adaptado de Suárez *et al.*, 2007).

O controlo desta levedura durante o processo de vinificação é uma tarefa difícil, devido principalmente à sua tolerância ao dióxido de enxofre. A utilização de 100 mg.L<sup>-1</sup> de SO<sub>2</sub> total é normalmente suficiente (Sponholz, 1993). Contudo, Toit *et al.* (2005) verificaram que na presença de SO<sub>2</sub>, *Brettanomyces* pode entrar num estado de viável mas não cultivável (VBNC). Por isso, pode não ser detetada utilizando os métodos microbiológicos convencionais (*i.e.* contagem em placa). Se isto acontecer antes do engarrafamento, pode resultar num crescimento exponencial de *Brettanomyces* durante o envelhecimento do vinho (Fugelsang e Edwards, 2007e). Outras estratégias de controlo incluem a clarificação e a filtração do vinho e a utilização de dimetildicarbonato (Comi *et al.*, 2005; Divol *et al.*, 2005). Outra opção de controlo pode ser o controlo da temperatura, uma vez que baixar a temperatura da adega para menos de 13°C ajuda a retardar o crescimento de *Brettanomyces* (Fugelsang e Edwards, 2007e).

Assim, as estratégias mais eficazes no controlo desta levedura são a utilização de SO<sub>2</sub> e a esterilização do vinho (filtração), ambos acompanhados com uma boa higienização (Suárez *et al.*, 2007).

#### 1.4. Leveduras do género *Saccharomyces*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 1.3) é considerada a protagonista da fermentação alcoólica no vinho (Martini, 2005). Este género inclui dois grupos: *Saccharomyces* em *sensu stricto*, representado pelas espécies associadas à indústria da fermentação (Vaughan-Martini e Martini, 1998), como *S. bayanus* (ou *S. uvarum*), *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. paradoxus* e *S. pastorianus* (ou *S. carlsbergensis*) (Stratford e James, 2003); e *Saccharomyces* em *sensu lato*, que incluem as espécies menos relacionados com a *S. cerevisiae* (Kurtzman e Fell, 1998; Rainieri *et al.*, 2003). As espécies com maior relevância enológica são *S. cerevisiae* e *S. bayanus* (Vicenzini *et al.*, 2005). A origem desta levedura responsável pela fermentação espontânea continua a ser dúbia, visto que alguns autores consideram que as adegas são a sua fonte e não a própria vinha (Deak e Beuchat, 1996; Martini, 2005). De facto, *S. cerevisiae* foi já isolada de paredes de adegas e superfícies de equipamentos (Dequin *et al.*, 2003). É caracterizada como glucofílica, pois prefere a glucose em vez da frutose (Fugelsang e Edwards, 2007d). As suas células apresentam forma ovoide, formando colónias opacas (Vicenzini *et al.*, 2005).

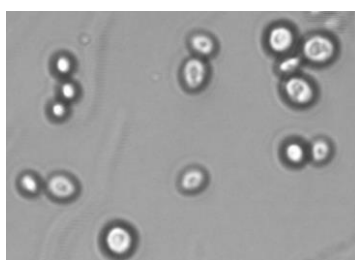


Figura 1.3 Observação microscópica de *Saccharomyces cerevisiae* (x400).

#### 1.5. Leveduras do género *Zygosaccharomyces*

O género *Zygosaccharomyces* compreende 13 espécies, como *Z. bailii*, *Z. bisporus*, *Z. gambellarensis*, *Z. kombuchaensis*, *Z. lentus*, *Z. machadoi*, *Z. mellis*, *Z. parabailii*, *Z. pseudobailii*, *Z. pseudorouxii*, *Z. rouxii*, *Z. sapae* e *Z. siamensis* (Hulin e Wheals, 2014). As espécies *Z. bailii*, *Z. bisporus* e *Z. rouxii* são associadas a leveduras de alteração, isoladas da uva, do mosto e do vinho (Fugelsang e Edwards, 2007e). É caracterizado pela sua grande resistência a meios de stresse, como a presença de etanol e elevados teores de açúcar, e aos mais comuns conservantes da indústria alimentar, nomeadamente dióxido de enxofre e ácido ascórbico (Comi *et al.*, 2005; Zuehlke *et al.*, 2013). Na adega, esta levedura pode ser encontrada em zonas de difícil higienização, como tubagens, bombas e válvulas, nomeadamente, na linha de engarrafamento (Comi *et al.*, 2005). A espécie

*Zygosaccharomyces bailii* (Figura 1.4) é uma das principais responsáveis pela alteração de vinhos brancos secos (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Rodriguez *et al.*, 2013). É osmofílica, osmotolerante e prefere fermentar a frutose em vez da glucose, sendo por isso uma levedura frutofílica (Emmerich e Radler, 1983; Fugelsang e Edwards, 2007). As células desta levedura podem ser ovóides, elipsoidais ou cilíndricas e a sua multiplicação é feita por gemulação (Vicenzini *et al.*, 2005). A nível da contaminação do vinho pode causar a produção de dióxido de carbono, formação de sedimentos ou turvação em vinhos engarrafados (Stratford e James, 2003).

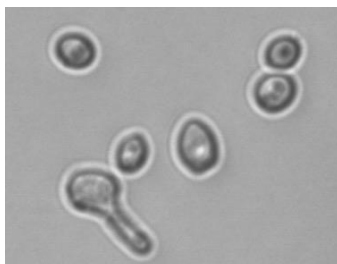


Figura 1.4 Observação microscópica de *Zygosaccharomyces bailii* (x400).

## 1.6. Controlo do crescimento microbiano no vinho

O controlo do crescimento e da atividade dos microrganismos de alteração exige uma boa compreensão da sua fisiologia, bioquímica e genética (Fleet, 2006). No processo de vinificação as leveduras de alteração representam o maior problema de contaminação (Toit e Pretorius, 2000). Estas desenvolvem-se no vinho acumulando os produtos do seu metabolismo que, na maioria dos casos, afetam o sabor e aroma do vinho (Lonvaud-Funel *et al.*, 2010a). Por isso, são utilizadas diversas estratégias de prevenção, recorrendo a conservantes, como o dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), o dimetildicarbonato (DMDC), o ácido sórbico e, recentemente, o quitosano (Tabela 1.2) (Zuehlke *et al.*, 2013).

Tabela 1.2 Conservantes utilizados em leveduras de alteração de vinhos (adaptado de Fugelsang e Edwards 2007a e Zuehlke *et al.*, 2013).

	Momento de aplicação	Utilização na adega	Inibição	
			<i>Z. bailii</i>	<i>B. bruxellensis</i>
<b>SO<sub>2</sub></b>	Vindima, estágio e engarrafamento	Frequente	Baixa	Moderada
<b>DMDC</b>	Engarrafamento	Moderada	Moderada	Moderada
<b>Ácido Sórbico</b>	Engarrafamento	Rara	Moderada	Baixa
<b>Quitosano</b>	Engarrafamento	<b>Emergente</b>	Moderada	Moderada

### 1.6.1. Dióxido de enxofre

O dióxido de enxofre, habitualmente conhecido como sulfuroso, é o conservante mais utilizado na vinificação, devido às suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas (Fugelsang e Edwards, 2007a). Este reduz significativamente a população microbiana fermentativa que põe em causa o crescimento da levedura *S. cerevisiae*, sem afetar a mesma (Henick-Kling *et al.*, 1998; Cocolin e Mills, 2003). A concentração de SO<sub>2</sub> molecular num vinho não é medida diretamente, isto é, a concentração é calculada sabendo a concentração de SO<sub>2</sub> livre e o valor do pH de um determinado vinho (Fugelsang e Edwards, 2007a). A quantidade de SO<sub>2</sub> molecular necessária a adicionar a um vinho para prevenir a contaminação ou crescimento de microrganismos varia com o pH, temperatura, quantidade e diversidade da população microbiana, fase de crescimento dos microrganismos, concentração de etanol presente, entre outros (Deak e Beuchat, 1996; Lonvaud-Funel *et al.*, 2010b).

Os vinhos que contêm este conservante têm obrigatoriamente de ser rotulados com as palavras “Contém Sulfitos”. Segundo o Regulamento (CE) Nº 606/2009 de 10 de Julho de 2009, no que respeita às práticas enológicas e as suas restrições, o teor de dióxido de enxofre nos vinhos, com exceção dos vinhos espumantes e dos vinhos licorosos, não pode exceder, no momento da sua colocação no mercado para consumo humano direto, 150 mg.L<sup>-1</sup>, no caso dos vinhos tintos e 200 mg.L<sup>-1</sup>, no caso dos vinhos brancos ou vinhos rosados ou “rosé”. Aos vinhos com teor de açúcares (expresso em glucose mais frutose) igual ou superior a 5 g.L<sup>-1</sup>, foi estabelecido um limite máximo de 200 mg.L<sup>-1</sup>, no caso dos vinhos tintos e 250 mg.L<sup>-1</sup>, no caso dos vinhos brancos ou rosados. Nos vinhos licorosos, o teor total de SO<sub>2</sub> não pode exceder os 150 mg.L<sup>-1</sup>, no caso de vinhos com teores de açúcares inferior a 5 g.L<sup>-1</sup> e os 200 mg.L<sup>-1</sup>, em vinhos com teores de açúcares igual ou superior a 5 g.L<sup>-1</sup>. Quanto aos vinhos espumantes, a quantidade total de SO<sub>2</sub>, não pode ultrapassar as 185 mg.L<sup>-1</sup> e os 235 mg.L<sup>-1</sup>, no caso de todas as categorias de vinhos espumantes de qualidade e no caso de outros vinhos espumantes, respetivamente (Tabela 1.3).

### 1.6.2. Dimetildicarbonato

O dimetildicarbonato, vulgarmente conhecido como DMDC, é um conservante utilizado na vinificação, particularmente ativo contra leveduras (Costa *et al.*, 2008). No vinho, a hidrólise de DMDC forma produtos secundários, como o metanol (Renouf *et al.*, 2008). Esta reação é muito rápida e depende da temperatura (Delfini *et al.*, 2002). É importante referir que a adição de DMDC ao vinho não produz níveis tóxicos de metanol (Stafford e Ough, 1976; Peterson e Ough, 1979; Lonvaud-Funel *et al.*, 2010b). O poder antimicrobiano deste

conservante resulta da capacidade de inativar enzimas microbianas responsáveis pela via fermentativa, como gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e álcool desidrogenase (Fugelsang e Edwards, 2007a).

Segundo o Regulamento CE Nº 606/2009 de 10 de julho de 2009, no que respeita às práticas e tratamentos enológicos autorizados, foi estabelecido um limite máximo de adição de DMDC ao vinho, para estabilização microbiológica, de 200 mg.L<sup>-1</sup>, sem resíduos detetáveis no vinho colocado no mercado (Tabela 1.3).

### 1.6.3. Ácido Sórbico

O ácido sórbico (2,4-ácido hexanodióico) é um ácido gordo de cadeia curta utilizado em sumos de fruta e em vinhos doces engarrafados, de modo a prevenir a re-fermentação causada, maioritariamente, pelo género *Saccharomyces* (De Rosa *et al.*, 1983; Renee Terrell *et al.*, 1993). Segundo Warth (1985), este conservante mostrou também ser eficaz na inibição de *Kloeckera apiculata* e *Pichia anomala* com concentrações de 156 e 168 mg.L<sup>-1</sup>, respetivamente e no controlo de *Schizosaccharomyces pombe* e *Z. bailii* com concentrações de 672 mg.L<sup>-1</sup>. As bactérias não são afetadas pelo ácido sórbico. Algumas espécies de bactérias podem até metabolizá-lo, provocando aromas desagradáveis nos vinhos (Fugelsang e Edwards, 2007a). O ácido sórbico não é solúvel em água, por isso este conservante é utilizado sob a forma de sorbato de potássio. Normalmente, é utilizado em conjugação com o dióxido de enxofre (Ough e Ingraham, 1960).

De acordo com o Regulamento (CE) nº 606/2009 da Comissão de 10 de Julho de 2009 o limite máximo de utilização de ácido sórbico sob a forma de sorbato de potássio é de 200 mg.L<sup>-1</sup> (quantidade máxima de ácido sórbico no vinho tratado colocado no mercado) (Tabela 1.3).

### 1.6.4. Quitosano

O quitosano é um polímero hidrofílico natural derivado da quitina (Figura 1.5). A quitina é uma substância que está presente no exoesqueleto de insetos e crustáceos, como o camarão, caranguejo e lagosta, e na parede celular de fungos, como *Aspergillus niger* (Goy *et al.*, 2009; Pillai *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2010). É composto por D-glucosamina (GlcN) e N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), distribuídas aleatoriamente ao longo da sua cadeia, com ligações β-(1,4) (Nardi *et al.*, 2014). O quitosano forma-se a partir da desacetilação alcalina da quitina, ou seja, a remoção do grupo acetilo, através de altas temperaturas. O grau de desacetilação influencia a sua solubilidade (Devlieghere *et al.*, 2004). É um polissacárido insolúvel na maioria dos solventes, mas solúvel em ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico

e ácido málico (Rabea *et al.*, 2003). As propriedades físicas e químicas deste polímero têm influência nas suas funcionalidades em relação à quitina: o seu peso molecular mais baixo, permite ter uma maior solubilidade que a quitina, uma vez que possui uma percentagem de grupos acetilo inferior (Goy *et al.*, 2009; Pillai *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2010). É definido como não tóxico, biodegradável e com grandes propriedades antimicrobianas (Dutta *et al.*, 2009; Mohanasrinivasan *et al.*, 2013). O efeito antimicrobiano do quitosano depende de vários factores como o peso molecular, o grau de desacetilação e o pH do meio (Rabea *et al.*, 2003; Zheng e Zhu, 2003; Goy *et al.*, 2009).

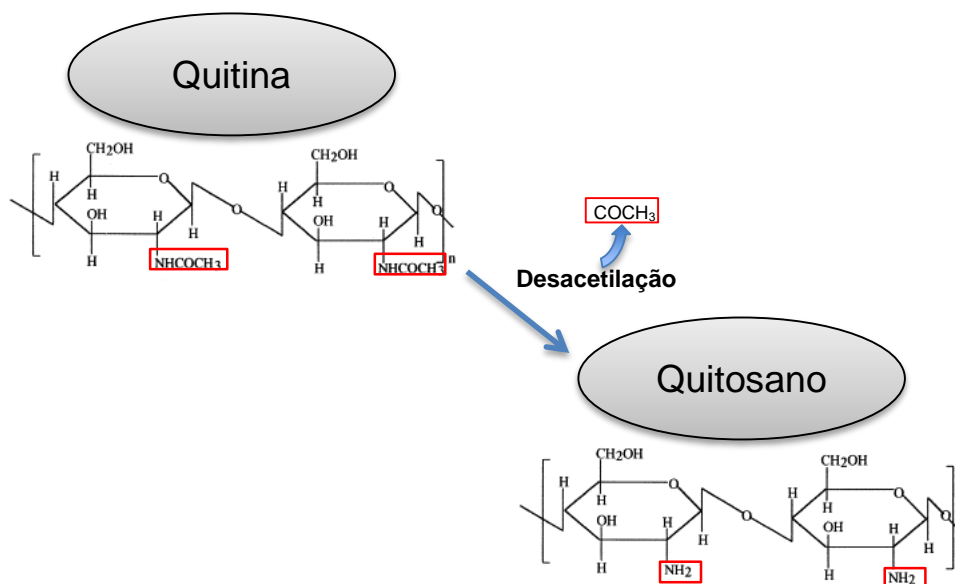


Figura 1.5 Moléculas de quitina e quitosano (adaptado de Pillet, 2010).

Embora a utilização do quitosano, como conservante na indústria da vinificação, ser relativamente recente, este tem mostrado ser eficiente no controlo do crescimento de leveduras, principalmente para *Z. bailii* e *B. bruxellensis* (Gómez-Rivas *et al.*, 2004; Zakrzewska *et al.*, 2005). Consequentemente, a *Organisation Internationale de la Vigne et du Vin* (OIV), em conjunto com a União Europeia, aprovaram a utilização de quitosano de origem fúngica como nova prática enológica (OIV, 2011). Segundo o Regulamento (UE) nº 53/2011 de 21 de janeiro de 2011, o tratamento por meio de quitosano derivado de *Aspergillus niger* deve ser no âmbito da redução do teor de metais pesados, nomeadamente ferro, chumbo, cádmio e cobre; da prevenção da casse férica e da casse cúprica; da redução de contaminantes eventuais, em especial a ocratoxina A e da redução das populações de microrganismos indesejáveis, nomeadamente *Brettanomyces*. A dose máxima de utilização deve ser inferior ou igual a 10 g.hL<sup>-1</sup>, para a redução de população microbiana (Tabela 1.3).

Tabela 1.3 Limite de aplicação de conservantes no vinho

<b>SO<sub>2</sub></b>	<b>Vinho com &lt; 5 g.L<sup>-1</sup> de teor em açúcares (expresso em glucose + frutose)</b>	
	Vinhos Tintos	≤ 150 mg.L <sup>-1</sup> Reg. (CE) nº606/2009, Anexo I B
	Vinhos Brancos e Rosados	≤ 200 mg.L <sup>-1</sup> Reg. (CE) nº606/2009, Anexo I B
	<b>Vinho com &gt; 5 g.L<sup>-1</sup> de teor em açúcares (expresso em glucose + frutose)</b>	
	Vinhos Tintos	≤ 200 mg.L <sup>-1</sup> Reg. (CE) nº606/2009, Anexo I B
	Vinhos Brancos e Rosados	≤ 250 mg.L <sup>-1</sup> Reg. (CE) nº606/2009, Anexo I B
<b>DMDC</b>	≤ 200 mg.L <sup>-1</sup>	Reg. (CE) nº606/2009
<b>Ácido Sórbito</b>	≤ 200 mg.L <sup>-1</sup>	Reg. (CE) nº606/2009
<b>Quitosano</b>	≤ 0,1 g.L <sup>-1</sup>	Reg. (CE) nº53/2011

#### 1.6.3.1. Modo de ação do quitosano

O modo de ação do quitosano nas leveduras é ainda considerado hipotético (Taillandier *et al.*, 2015). Contudo existem estudos que descrevem os principais mecanismos de ação do quitosano em *Brettanomyces/Dekkera* e, maioritariamente, em bactérias (Kong *et al.*, 2010).

O primeiro mecanismo de ação resulta da natureza catiónica da molécula de quitosano, através da interação entre a carga positiva da molécula de quitosano e a carga negativa da membrana celular dos microrganismos (Finlay *et al.*, 2003). Este modelo baseia-se nas forças eletrostáticas, uma vez que afeta a permeabilidade da parede celular, provocando desequilíbrios osmóticos, que consequentemente inibem o crescimento dos microrganismos (Shahidi *et al.*, 1999). Da mesma forma, o quitosano interfere com a hidrólise de peptidoglicanos da parede celular de microrganismos, provocando a fuga dos eletrólitos intracelulares, tais como iões de potássio e outros constituintes proteicos de baixo peso molecular (proteínas, ácidos nucleicos) (Devlieghere *et al.*, 2004). Este mecanismo também é explicado por Tokura *et al.* (1996), que referem a capacidade do quitosano formar uma camada polimérica na superfície da célula, alterando a permeabilidade, evitando a entrada de nutrientes na célula.



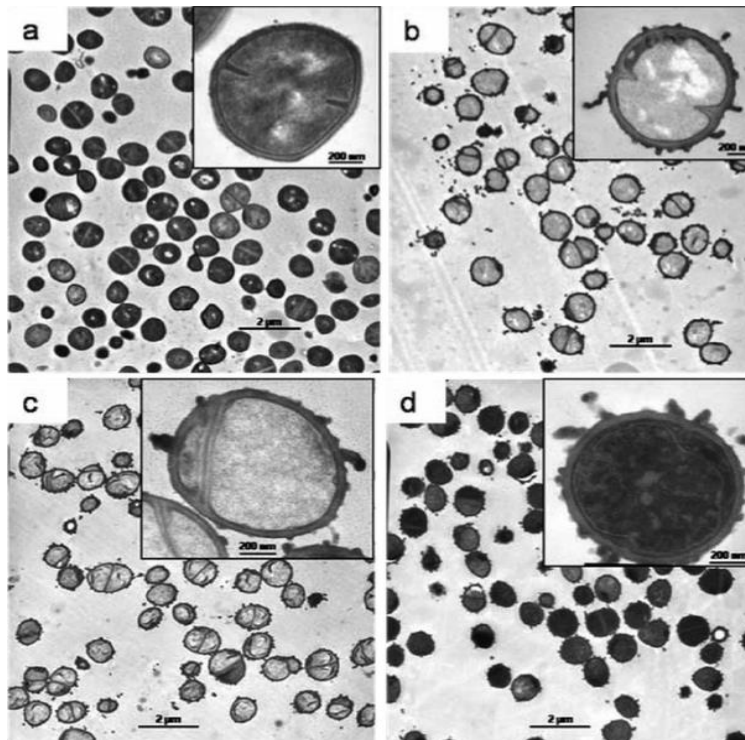


Figura 1.6 Células de *Staphylococcus simulans* 22 no microscópio electrónico de transmissão. Controlo (a); tratamento com 10x CMI de quitosano durante 5 minutos (b); durante 20 minutos (c) e durante 60 minutos (d). As aproximações mostram células individualizadas (adaptado de Raafat *et al.*, 2008).

Raafat *et al.* (2008) comprovaram este modelo, através de um microscópio electrónico de transmissão, onde constatarem as alterações das células de *Staphylococcus simulans* 22 aquando da exposição à carga positiva da molécula de quitosano (Figura 1.6). Foi então possível identificar as moléculas de quitosano ligadas às membranas das células desta bactéria. Foi observado que a membrana celular desligou-se parcialmente da parede celular, originando o efluxo de iões e água, com uma consequente diminuição da pressão interna da bactéria. O mesmo pode observar-se em relação às leveduras (Figura 1.7).

De acordo com este modelo de interações electroestáticas é possível afirmar que quanto maior o número de aminas cationizadas, maior o poder antimicrobiano, o que explica, pelo menos em parte, que o quitosano tem uma maior atividade antimicrobiana que a quitina (Másson *et al.*, 2008).

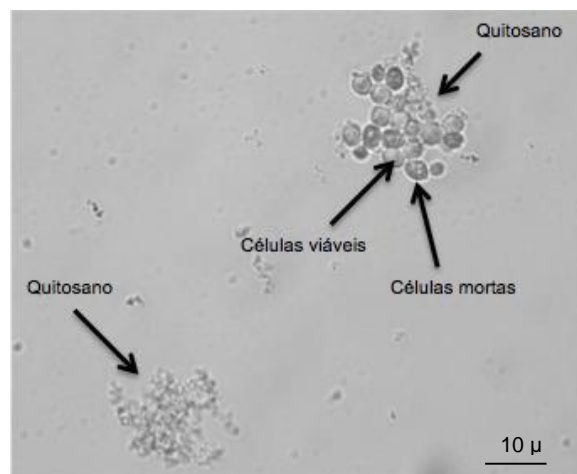


Figura 1.2 Observação microscópica de quitosano e *Saccharomyces cerevisiae* no vinho (x400).

Outro mecanismo de ação proposto é a capacidade que a molécula de quitosano possui de ligar-se especificamente ao DNA dos microrganismos, através da sua entrada no citosol, interferindo com a síntese de mRNA e proteínas (Sudarshan *et al.*, 1992). Contudo, Raafat *et al.* (2008) concluíram que apesar da possibilidade de considerar este efeito do quitosano como um mecanismo de ação, a probabilidade de ocorrer é muito baixa. Prevalece o efeito do quitosano atuar essencialmente como um disruptor da membrana externa e não como uma molécula penetrante (Raafat *et al.*, 2008).

O quitosano possui uma atividade quelante, ou seja, liga-se seletivamente a íons metálicos, como zinco, cobre, inibindo o crescimento microbiano (Cuero *et al.*, 1991; Kong *et al.*, 2010). Esta aptidão resulta do facto dos grupos amina presentes na molécula de quitosano captarem os cátions metálicos. Geralmente, este mecanismo de ação é mais eficiente para valores elevados de pH (pH > 6,7) (Finlay *et al.*, 2003). Um modelo baseado no sistema quitosano-Cu, explica a relação do pH com a proporção de áreas disponíveis para interagir com a estrutura de polissacáridos (Guibal, 2004).

Tabela 1.4 Mecanismos de ação do quitosano.

Mecanismos de ação do quitosano			Referências bibliográficas
<b>Interação Eletrostática</b>	Interação entre a carga positiva da molécula de quitosano e a carga negativa da membrana celular dos microrganismos.	Altera a permeabilidade da parede celular e interfere com a hidrólise de petidoglicanos.	Devlieghere <i>et al.</i> , 2004; Finlay <i>et al.</i> , 2003 e Shahidi <i>et al.</i> , 1999.
<b>Atividade quelante</b>	Liga-se seletivamente a íons metálicos.	Inibe o crescimento microbiano.	Cuero <i>et al.</i> , 1991; Finlay <i>et al.</i> , 2003 e Kong <i>et al.</i> , 2010.
<b>Penetração no citosol</b>	Liga-se ao DNA dos microrganismos.	Interfere com a síntese de mRNA dos microrganismos.	Sudarshan <i>et al.</i> , 1992.

## 1.7. Enquadramento e Objetivos

O processo de vinificação compreende várias fases nas quais diversos microrganismos têm a capacidade de se desenvolver e alterar a qualidade do vinho (Comi *et al.*, 2005). Estas alterações consistem na presença de odores e sabores desagradáveis, na formação de filmes nos vinhos armazenados, na turvação e na produção de sedimentos e gases em vinhos engarrafados (Toit e Pretorius, 2000; Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003). As leveduras são as principais responsáveis por estas alterações, uma vez que conseguem resistir às condições adversas do vinho (Deak e Beuchat, 1996). A espécie *S. cerevisiae* desempenha um papel muito importante na indústria do vinho, uma vez que é a principal condutora da fermentação alcoólica (Martini, 2005), mas também pode ter efeitos indesejáveis (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003). Por outro lado, leveduras como *B. bruxellensis* e *Z. bailii* representam uma verdadeira ameaça para esta indústria (Stratford e James, 2003; Lonvaud-Funel *et al.*, 2010a). De modo a controlar o crescimento e desenvolvimento das leveduras de alteração utilizam-se conservantes, nomeadamente dióxido de enxofre, dimetildicarbonato, ácido sórbico e quitosano (Zuehlke *et al.*, 2013).

O dióxido de enxofre é o conservante mais utilizado na indústria do vinho (Fugelsang e Edwards, 2007a). Contudo, devido às crescentes preocupações com a saúde e à preferência dos consumidores por alimentos naturais, juntamente com uma legislação rigorosa, surge a tendência para estudar produtos alternativos, como o quitosano (Enrique *et al.*, 2007; Zuehlke *et al.*, 2013). O quitosano forma-se a partir da desacetilação da quitina e representa um amplo grupo de moléculas poliméricas catiónicas (Kong *et al.*, 2010). Único entre a maioria dos polissacáridos, o quitosano é definido como não tóxico, biodegradável e com grandes propriedades antimicrobianas (Dutta *et al.*, 2009; Mohanasrinivasan *et al.*, 2013).

Tendo em conta as características do quitosano e para melhor entender o efeito desta molécula em leveduras de alteração nos vinhos estabeleceram-se os seguintes objetivos:

- Determinar as concentrações mínimas letais do quitosano em três espécies de leveduras de alteração de vinhos;
- Avaliar o efeito do quitosano na produção de 4-etilfenol.

## 2. Materiais e Métodos

## 2.1. Leveduras utilizadas

Foram utilizadas estirpes da coleção de leveduras do Laboratório de Microbiologia, do Instituto Superior de Agronomia: *Brettanomyces bruxellensis* (ISA 2202), *Saccharomyces cerevisiae* (ISA 1083) e *Zygosaccharomyces bailii* (ISA 2419). Estas foram mantidas em placas de GYP (Glucose Yeast Peptone Agar: glucose [Copam, Loures, Portugal] 20 g.L<sup>-1</sup>, extracto de levedura [Biokar Diagnostics, Beauvais, França] 5 g.L<sup>-1</sup>, peptona [Biokar Diagnostics, Beauvais, França] 10 g.L<sup>-1</sup> e 20 g.L<sup>-1</sup> agar [Iberagar, Coima, Portugal]).

## 2.2. Preparação do vinho

Foi utilizado um vinho tinto do Alentejo, com um teor de álcool de 12,33%, medido através de ebuliómetro (Ecofiltra, Portugal) e um pH de 3,5, medido com um potenciómetro (Lab 850, Schott AG Instruments, Mainz, Alemanha). De forma a standardizar os ensaios pretendia-se um vinho com um teor de álcool de 12%, sendo por isso ajustado com uma solução de 5 g.L<sup>-1</sup> de ácido tartárico (Sigma Aldrich, EUA). O vinho foi posteriormente esterilizado com uma membrana de 0,22 µm de poro (Cellulose Nitrate Filter, Sartorius Stedim, Biotech, Alemanha).

## 2.3. Preparação do inóculo em meio GYP líquido

Inicialmente foi recolhida biomassa das culturas frescas de cada levedura e colocada em GYP líquido, a 25°C, durante 5 dias. Numa primeira etapa as leveduras foram adaptadas ao meio GYP com 6% de álcool, sendo o tempo de incubação de 5 dias. Após estarem adaptadas a 6% de álcool, foi iniciada a segunda etapa de adaptação ao meio GYP com 9% de álcool (Figura 2.1).

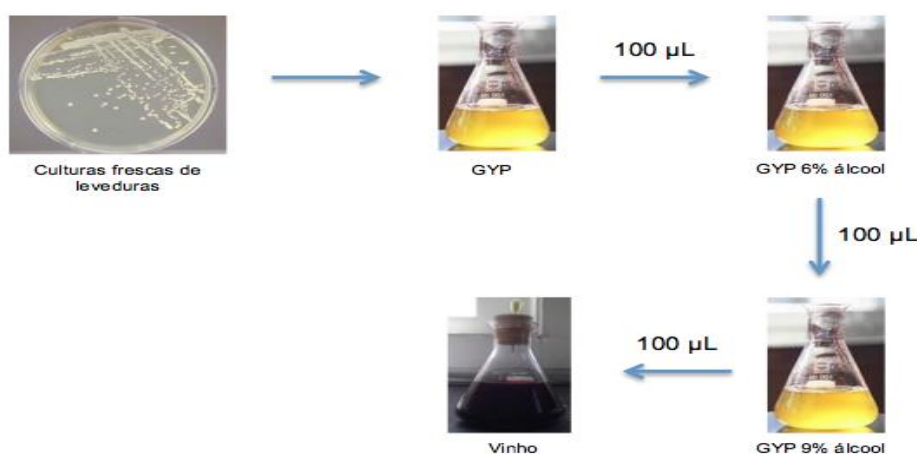


Figura 2.1 Preparação do inóculo.

## 2.4. Ensaio em vinho

Após adaptação das células ao meio GYP líquido com 9% de álcool, o vinho foi inoculado com uma concentração celular inicial de  $10^4$  células.mL<sup>-1</sup> de cada uma das estirpes. Os ensaios decorreram em balões de Erlenmeyer com rolhas de borracha perfuradas com agulhas, de forma a simular um ambiente de microoxigenação, sendo estes guardados num local escuro, com uma temperatura de  $18 \pm 2^\circ\text{C}$ , de forma a proporcionar um ambiente semelhante ao de adega.

A viabilidade celular representada pelo crescimento de cada uma das estirpes de leveduras realizou-se em placas de GYP, através da inoculação de gotas de 25 µL, de cada diluição, sendo que este procedimento foi realizado em duplicado. As placas foram incubadas a  $25^\circ\text{C}$ , durante 5 dias. Findo o tempo de incubação, as diluições contendo colónias individualizadas foram contadas e o número de unidades formadoras de colónias (UFC), por mL, foi aferido.

Juntamente com este método, foi realizada a contagem das células em hemocitómetro, calculando-se a vitalidade celular dada pela fórmula:

$$\text{Vitalidade Celular (\%)} = \frac{\text{número de células viáveis}}{\text{número de células viáveis} + \text{número de células não viáveis}} \times 100$$

Para tal, foi centrifugado 1 mL do inóculo de cada uma das estirpes de leveduras, durante 10 minutos a 13200 rpm (Eppendorf Microcentrifuge 5415D, Hamburgo, Alemanha). Posteriormente, o sobrenadante, foi desprezado e ressuspendeu-se o pellet em 1 mL de solução de Ringer (Biokar Diagnostics, Beauvais, França). Finalmente, corou-se a amostra com azul de metileno (1:1) (Merck, Darmstadt, Alemanha) e colocou-se no hemocitómetro para contagem ao microscópio (Leitz-Dialux 20, Alemanha).

## 2.5. Ensaio em vinho com adição de quitosano de origem fúngica

Quando as leveduras se encontravam adaptadas ao vinho, ou seja, com uma concentração celular de cerca de  $10^6$  células.mL<sup>-1</sup>, iniciou-se o ensaio com quitosano. Uma vez que o quitosano (No Brett Inside®, Lallemand, França) não apresenta solubilidade em água, foi utilizada uma solução de 1% de ácido acético (Panreac, Espanha), de forma a obter uma solução stock de quitosano de 10 g.L<sup>-1</sup>. Assim, prepararam-se balões de Erlenmeyer com concentrações diferentes de quitosano (0,05; 0,1; 0,5 e 1 g.L<sup>-1</sup>) e um controlo com 1% ácido acético, aos quais foi adicionado o inóculo de vinho. Este ensaio foi realizado em duplicado, sendo os balões armazenados em local escuro, a uma temperatura de  $18 \pm 2^\circ\text{C}$ , de forma a proporcionar um ambiente semelhante ao de adega.

A viabilidade celular foi observada em placas de GYP, como anteriormente referido no ponto 2.4.1. Para além deste procedimento, realizou-se a contagem das células em hemocitómetro para posterior cálculo da vitalidade celular (ver ponto 2.4.1.).

## **2.6. Ensaio em vinho com adição de quitosano e enzimas (pectinases e glucanases)**

Como o quitosano (OenoBrett®, Laffort, França) não apresenta solubilidade em água, foi usada uma solução de 1% de ácido acético, com o objectivo de obter uma solução stock de quitosano de 10 g.L<sup>-1</sup>. Desta forma, foram preparados balões de Erlenmeyer com concentrações diferentes de quitosano, ou seja, 0,05 g.L<sup>-1</sup> para *Z. bailii*, 0,1 g.L<sup>-1</sup> para *B. bruxellensis* e 0,5 g.L<sup>-1</sup> para *S. cerevisiae*, e um controlo com 1% de ácido acético. O ensaio foi realizado em duplicado e os balões foram armazenados em local escuro, a uma temperatura de 18±2°C, de forma a proporcionar um ambiente semelhante ao de uma adega.

A viabilidade celular e a vitalidade celular foram monitorizadas ao longo do ensaio (ver ponto 2.4.1.).

## **2.7. Determinação de fenóis voláteis**

Para este ensaio foram apenas seleccionados vinhos inoculados com *Brettanomyces bruxellensis*, após estar adaptada ao vinho. No decorrer do ensaio em vinho com adição de quitosano e enzimas (ver ponto 2.6.), foram retirados 14 mL da amostra e conservados a -20°C até ao momento de extração.

### **2.7.1. Extração de 4-vinilfenol e 4-etilfenol**

As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente. Foram retirados 12 mL da amostra e acertou-se o pH a 8, através da utilização de um potenciómetro (Lab 850, Schott AG Instruments, Mainz, Alemanha). Para acerto de pH foram utilizadas soluções de NaOH (Merck, Alemanha) e de HCL (Merck, Alemanha). Depois, num balão volumétrico de 10 mL, colocaram-se 0,5 mL de padrão interno (10 g.L<sup>-1</sup> de 3,4 Dimetil-fenol; Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) e perfez-se o volume com a amostra a pH 8. De seguida, foi retirado o volume total do balão volumétrico de 10 mL para um balão volumétrico de 25 mL, com um agitador magnético previamente colocado, e foram adicionados 4 mL de solução a 50% de éter/hexano (VWR International, Radnor, EUA/Merck, Alemanha). Os balões foram colocados num agitador (Heating Magnetic Stirrer FB 15001, Fisher Scientific, EUA) durante 5 minutos. Após agitação, foi efetuada uma decantação para separar a fase aquosa e a fase orgânica. A fase orgânica foi colocada num frasco. Depois da primeira decantação, foram adicionados 2 mL de solução de éter/hexano a 50%. Os balões foram colocados novamente

num agitador durante 5 minutos, voltando a decantar-se a amostra. Após a segunda decantação, foram adicionados mais 2 mL de solução éter/hexano 50%, procedendo-se à agitação durante 5 minutos e decantação. No fim de cada decantação, a fase orgânica foi colocada num frasco à parte. Depois do processo de decantação, foi utilizada uma pipeta de Pasteur de modo a colocar o sobrenadante da fase orgânica num tubo vial, para injeção automática no equipamento de cromatografia gasosa (CG) (Varian CP-3800 com Stabilwax 30 m, 0,25 mm e com uma coluna 0,25 µL).

### 2.7.2. Análise cromatográfica

O programa utilizado para a análise cromatográfica inicia com uma temperatura de 50°C. A temperatura aumenta cerca de 10°C por minuto até uma segunda temperatura de 215°C. Após atingir esta temperatura, a temperatura aumenta 20°C a cada minuto, atingindo uma temperatura final de 250°C. Esta temperatura final mantém-se durante 10 minutos. A temperatura de injeção foi de 230°C e a temperatura de deteção foi de 250°C. Este equipamento utiliza o software Galaxy Chromatography Workstation V1.9.3.2. que permite a análise dos dados recolhidos através do CG.

### 2.7.3. Quantificação do 4-etilfenol

A quantificação do 4-etilfenol foi feita através da identificação dos picos correspondentes ao 4-etilfenol e ao 3,4-dimetilfenol (padrão interno). Para cada um destes picos foi recolhido o valor do tempo de retenção e a área. Através destes valores foi determinada a concentração de 4-etilfenol. A análise dos dados foi feita através do software Galaxy Chromatography Workstation (Figura 2.2).

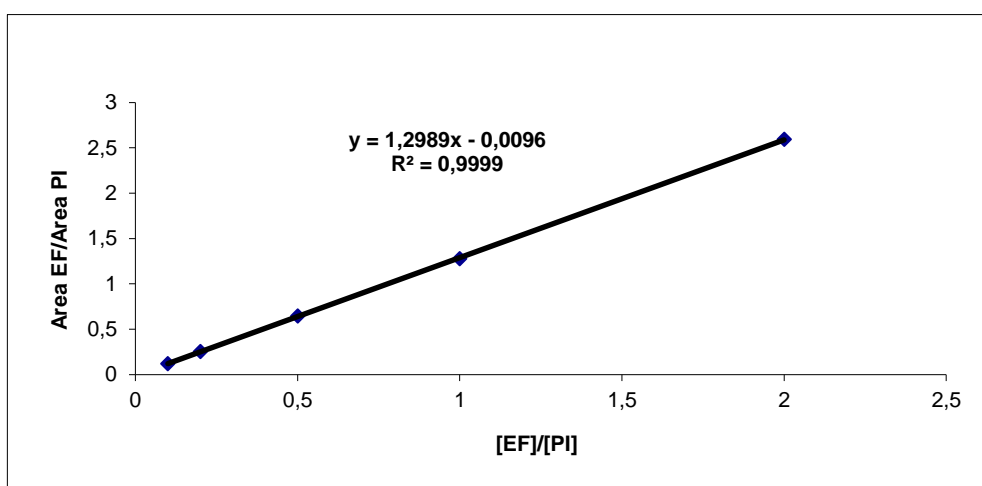


Figura 2.2 Curva de calibração de 4-etilfenol no CG.



### 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Estudo do efeito do quitosano No Brett Inside® na viabilidade de leveduras de vinhos

#### 3.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

O efeito da atividade do quitosano No Brett Inside® na estirpe *S. cerevisiae* ISA 1083 está representado na Figura 3.1. O crescimento celular foi semelhante ao do controlo para as concentrações de 0,1 até 0,5 g.L<sup>-1</sup>. No caso da concentração de 0,05 g.L<sup>-1</sup>, foram atingidos maiores valores de densidade celular em relação ao controlo. Ao fim de 44 dias atingiram-se valores semelhantes de densidade celular para todas as concentrações de quitosano testadas, exceto para o valor mais elevado. Nesta concentração de 1 g.L<sup>-1</sup>, não se verificou aumento da viabilidade celular medida por crescimento em placa.

A vitalidade celular (contagem em hemocítmetro) foi maior do que 95% em todos as condições testadas. No 44º dia do ensaio, a vitalidade celular diminuiu para 66% no controlo e para cerca de 30% em todas as concentrações do quitosano utilizadas (Tabela 3.1).

Segundo Ohtakara *et al.* (1988), o quitosano pode ser hidrolisado através das enzimas quitanases e quitonases, o que pode explicar o pequeno aumento da viabilidade observado para a concentração de 0,05 g.L<sup>-1</sup> de quitosano. Isto é, este aumento pode ser causado devido a uma hidrólise do quitosano utilizado como nutriente para concentrações mais baixas. Gómez-Rivas *et al.* (2004) observaram que são necessárias concentrações elevadas de quitosano (> 6 g.L<sup>-1</sup>) para existir uma diminuição no crescimento celular da espécie *S. cerevisiae*, relativamente ao crescimento típico de outras leveduras. Roller e Covill (1999) verificaram que existe inibição do crescimento de uma estirpe de *S. cerevisiae* para concentrações de 0,4 g.L<sup>-1</sup> de quitosano, o que não coincidiu com os resultados neste ensaio. De acordo com Roller e Covill (1999), para concentrações de 0,4 g.L<sup>-1</sup> de quitosano, algumas espécies crescem em modo bifásico. Isto é, apresentam uma curva de crescimento diáuxico, o que revela a utilização sequencial de substratos. Um exemplo deste comportamento observa-se em *S. cerevisiae* pela utilização sequencial de glucose e de etanol (Lewis *et al.*, 1993; Deak e Beuchat, 1996). A diferença de resultados pode estar relacionada com as diferenças nos métodos dos ensaios. No estudo destes últimos autores foi utilizado um quitosano glutamato em sumo de maçã. Gómez-Rivas *et al.* (2004) utilizaram também um quitosano diferente, de origem em crustáceos. As diferenças relativas à origem do quitosano, leva a diferentes graus de desacetilação dos mesmos, o que também pode explicar a diferença de resultados. O quitosano glutamato apresenta um grau de desacetilação de 75-95%, enquanto o quitosano de origem em crustáceos tem um grau de desacetilação de 91%. Para além destas diferenças, a utilização de uma estirpe diferente também pode ter influência.

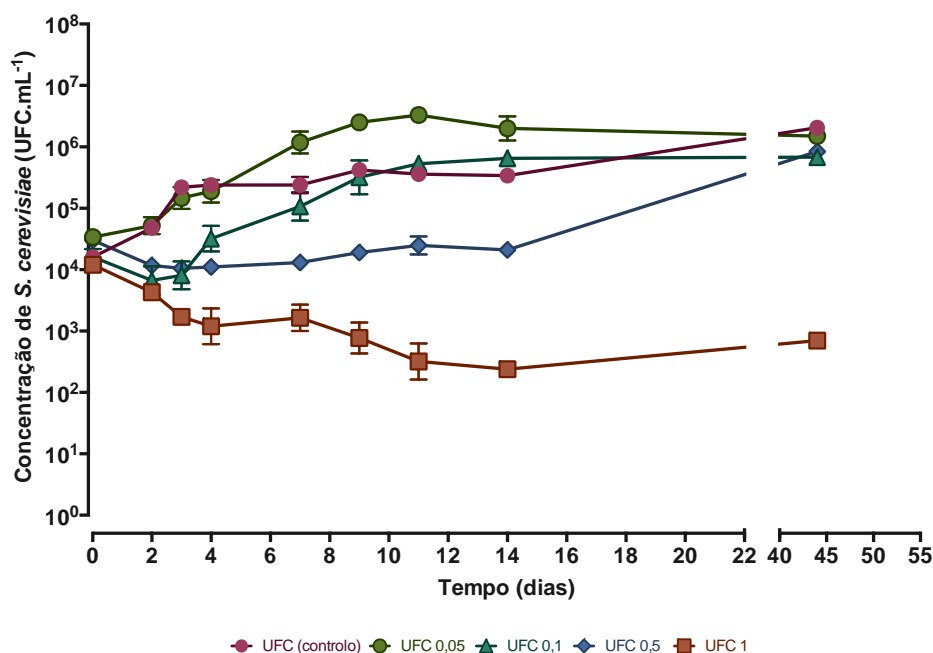


Figura 3.1 Comportamento da estirpe *S. cerevisiae* ISA 1083 com diferentes concentrações de quitosano.

### 3.1.2. *Zygosaccharomyces bailii*

A Figura 3.2 mostra o efeito da atividade do quitosano No Brett Inside® na estirpe *Z. bailii* ISA 2419. Observou-se uma sensibilidade elevada desta levedura em relação ao quitosano, nomeadamente para as concentrações superiores a 0,1 g.L<sup>-1</sup> de quitosano. Nas concentrações de 0,1 e 0,5 g.L<sup>-1</sup>, observou-se uma redução da densidade celular até ao dia 13 do ensaio. A partir deste dia e até ao final do ensaio não se verificou viabilidade celular medida por crescimento em placa. Na concentração de 1 g.L<sup>-1</sup> a perda de viabilidade ocorreu em menos de dois dias. Contudo, para a concentração mais baixa utilizada neste ensaio, ou seja para 0,05 g.L<sup>-1</sup>, apesar de um decréscimo da densidade celular relativamente ao controlo durante os primeiros 17 dias do ensaio, constatou-se um aumento da densidade celular, nos últimos 2 dias do ensaio.

No controlo a vitalidade celular atingiu o seu máximo (100%) ao 3º e 4º dia do ensaio. A partir destes dias registou-se uma redução da vitalidade, para valores de 42%. Relativamente à concentração 0,05 g.L<sup>-1</sup>, não foi detetada vitalidade celular, mas nos dias 50 e 55 do ensaio foram observados valores de 85% e 53%, respetivamente (Tabela 3.1).

Segundo Roller e Covill (1999), *Z. bailii* é uma das espécies mais sensíveis ao quitosano. Estudos realizados por estes autores demonstraram uma inibição total com concentrações de 0,1 g.L<sup>-1</sup> de quitosano, ao fim de 9 dias de ensaio. No entanto, num estudo com uma

estirpe diferente, estes autores não conseguiram inibir o crescimento desta levedura para concentrações de 0,4 g.L<sup>-1</sup>.

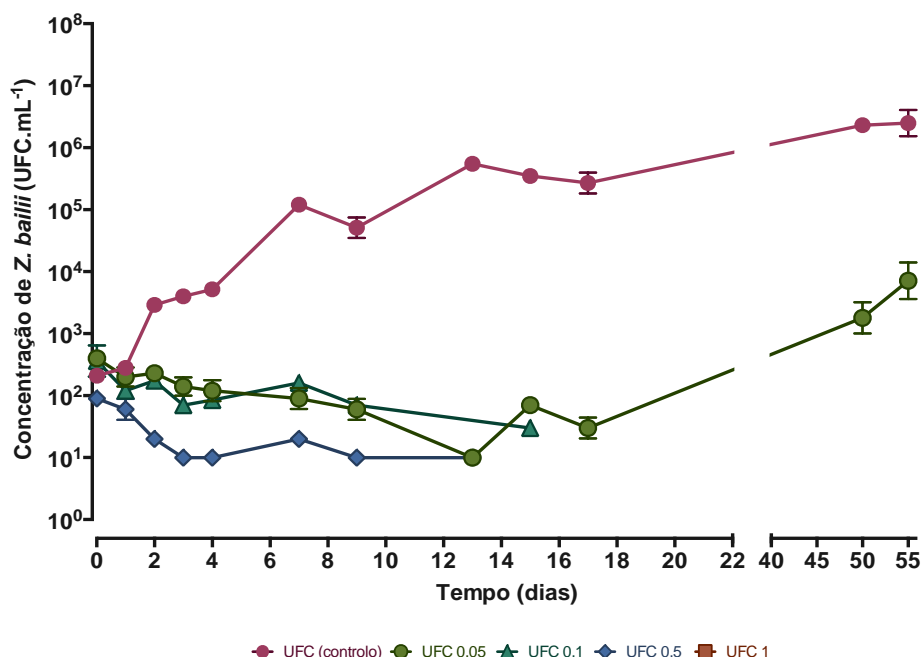


Figura 3.2 Comportamento da estirpe *Z. bailii* ISA 2419 com diferentes concentrações de quitosano.

### 3.1.3. *Brettanomyces bruxellensis*

O efeito do quitosano No Brett Inside® na estirpe *B. bruxellensis* ISA 2202 está demonstrado na Figura 3.3. A densidade celular para todas as concentrações de quitosano foi inferior à do controlo, o que significa que esta espécie apresenta sensibilidade à sua ação antimicrobiana. Para concentrações de 0,5 e 1 g.L<sup>-1</sup> não foram detetados valores de viabilidade e vitalidade celular ao longo do ensaio. Por outro lado, para concentrações de 0,05 e 0,1 g.L<sup>-1</sup>, notou-se um ligeiro aumento da densidade celular. Na concentração de 0,05 g.L<sup>-1</sup>, apesar da redução da densidade celular no 1º dia do ensaio, registaram-se valores crescentes a partir do dia 10 até ao fim do ensaio. Para a concentração de 0,1 g.L<sup>-1</sup> observou-se um decréscimo da densidade celular no 2º dia do ensaio. Contudo, a partir do 17º dia registaram-se valores crescentes da mesma.

Em relação ao controlo registaram-se valores de vitalidade celular semelhantes ao longo do ensaio (100%), exceto para o último dia do ensaio (dia 48) no qual foi observado um valor de 45%. Para as concentrações de 0,05 e 0,1 g.L<sup>-1</sup> a vitalidade celular diminuiu durante o ensaio para valores não detetáveis, até ao dia 22. Em ambos os casos ao 48º dia foram observados valores de vitalidade celular na ordem dos 75% (Tabela 3.1).

Estudos realizados no Instituto Enológico dos Vinhos de Borgonha (Institut Oenologique des Vins de Bourgogne Nuits-Saint-Georges), confirmaram que concentrações de 0,04 g.L<sup>-1</sup> do quitosano No Brett Inside® eram suficientes para inibir totalmente o crescimento da *B. bruxellensis* (Pillet, 2010). Outro estudo mais recente (Portugal *et al.*, 2013) demonstrou que com uma concentração de 0,062 g.L<sup>-1</sup> foi possível inibir várias estirpes de *B. bruxellensis*. Neste ensaio, só foi possível verificar a inibição total para a concentração de 0,5 g.L<sup>-1</sup>. A diferença de concentrações mínimas inibitórias pode estar relacionada com as diferentes estirpes testadas e com o método em que o ensaio realizado, pois estes últimos autores utilizaram o método de diluição em placa de microtitulação. Por outro lado, Gómez-Rivas *et al.* (2004) só conseguiram controlar o crescimento de *B. bruxellensis* para a concentrações de 6 g.L<sup>-1</sup>. A disparidade de resultados pode estar relacionada com o método do ensaio. No estudo de Gómez-Rivas *et al.* (2004), a concentração de glucose do meio foi de 30 g.L<sup>-1</sup>, a concentração inicial de células foi de 10<sup>5</sup> células.mL<sup>-1</sup> e as condições de incubação foram a 30°C num agitador orbital. No presente ensaio foi utilizado vinho, uma concentração inicial de 10<sup>4</sup> células.mL<sup>-1</sup> e as condições de armazenamento foram a 18±2°C sem agitação. As diferentes estirpes utilizadas podem, mais uma vez, influenciar os resultados. Outro aspeto que pode alterar a eficácia do quitosano é a sua origem, pois os autores Gómez-Rivas *et al.* (2004) utilizaram um quitosano de origem em crustáceos e o quitosano utilizado neste ensaio foi um quitosano de origem fúngica (*Aspergillus niger*).

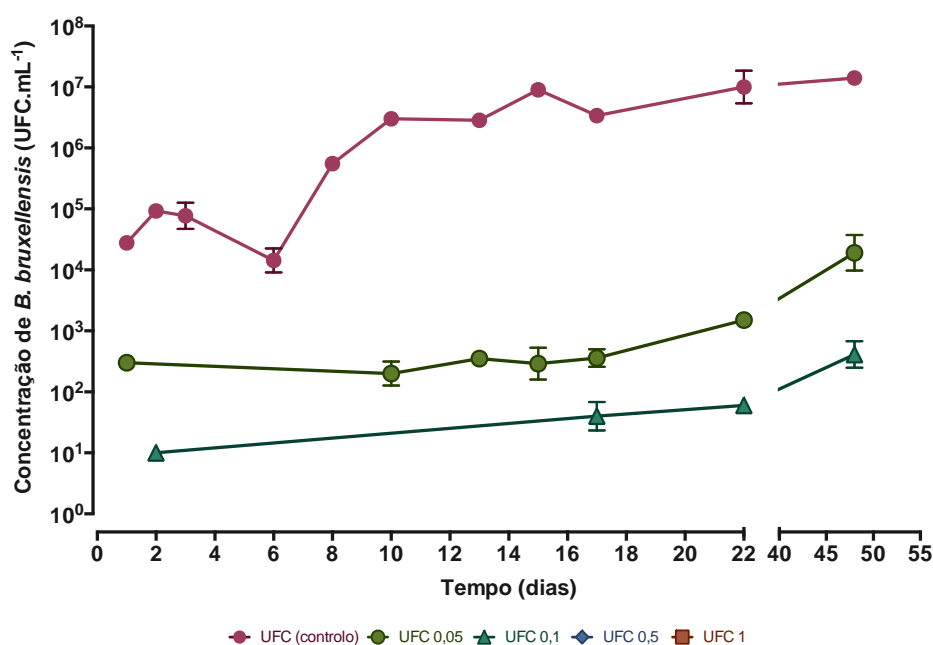


Figura 3.3 Comportamento da estirpe *B. bruxellensis* ISA 2202 com diferentes concentrações de quitosano.

Tabela 3.1 Vitalidade celular de cada estirpe de levedura para o último dia do ensaio.

Leveduras	[ ] quitosano (g.L <sup>-1</sup> )	Vitalidade celular (%)
<b><i>S. cerevisiae</i></b>	Controlo	66
	0,05	27
	0,1	25
	1	29
<b><i>Z. bailii</i></b>	Controlo	42
	0,05	53
<b><i>B. bruxellensis</i></b>	Controlo	45
	0,05	75
	0,1	72

### 3.1.4. Concentração mínima letal

A partir da avaliação dos resultados enunciados, foi possível realizar a tabela de concentrações mínimas letais de quitosano No Brett Inside® para as três espécies de leveduras (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 Concentração mínima letal para o quitosano No Brett Inside® nas três estirpes de leveduras.

Concentração mínima letal (g.L <sup>-1</sup> )			
No Brett Inside®	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Z. bailii</i>	<i>B. bruxellensis</i>
	> 1	0,1	0,5

### 3.2. Estudo do efeito do quitosano OenoBrett® na viabilidade de leveduras de vinhos

O efeito da atividade do quitosano OenoBrett® está representado nas Figuras 3.4, 3.5 e 3.6. Foram selecionadas apenas as concentrações de 0,05; 0,1 e 0,5 g.L<sup>-1</sup>, para as espécies *Z. bailii*, *B. bruxellensis* e *S. cerevisiae*, respetivamente. A seleção das concentrações deste quitosano baseou-se nas concentrações mais baixas de quitosano No Brett Inside® com efeito inibitório na viabilidade de cada uma das espécies estudadas. Comparando com os resultados obtidos usando o quitosano No Brett Inside® nas mesmas concentrações, verificou-se que apesar da viabilidade celular diminuir ao longo do ensaio e ser inferior à dos controlos, nenhuma das concentrações foi eficaz na inibição do crescimento das espécies consideradas.

Apesar da redução da viabilidade celular nos primeiros 17 dias do ensaio, houve recuperação celular após 41 dias de todas as espécies estudadas. A espécie *Z. bailii* (Figura

3.4) foi a levedura que apresentou maior resistência a este quitosano, mantendo-se com um crescimento celular constante, semelhante ao crescimento do controlo. A levedura *S. cerevisiae* (Figura 3.5) apresentou um decréscimo ligeiro nos primeiros dias do ensaio, contudo no fim do ensaio aumentou a sua viabilidade celular para valores semelhantes aos do controlo. A levedura *B. bruxellensis* (Figura 3.6) demonstrou uma maior sensibilidade ao quitosano, pois houve redução significativa da sua densidade celular. Ainda assim, no término do ensaio (41 dias) houve um ligeiro aumento da densidade celular, mantendo-se inferior à do controlo. Relativamente à concentração de 4-etilfenol esta manteve-se constante e não registou valores significativos (inferiores a  $300 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) (Figura 3.6).

Estes resultados mostraram que este quitosano apresenta menor eficácia na inibição do crescimento microbiano, comparativamente ao quitosano No Brett Inside®.

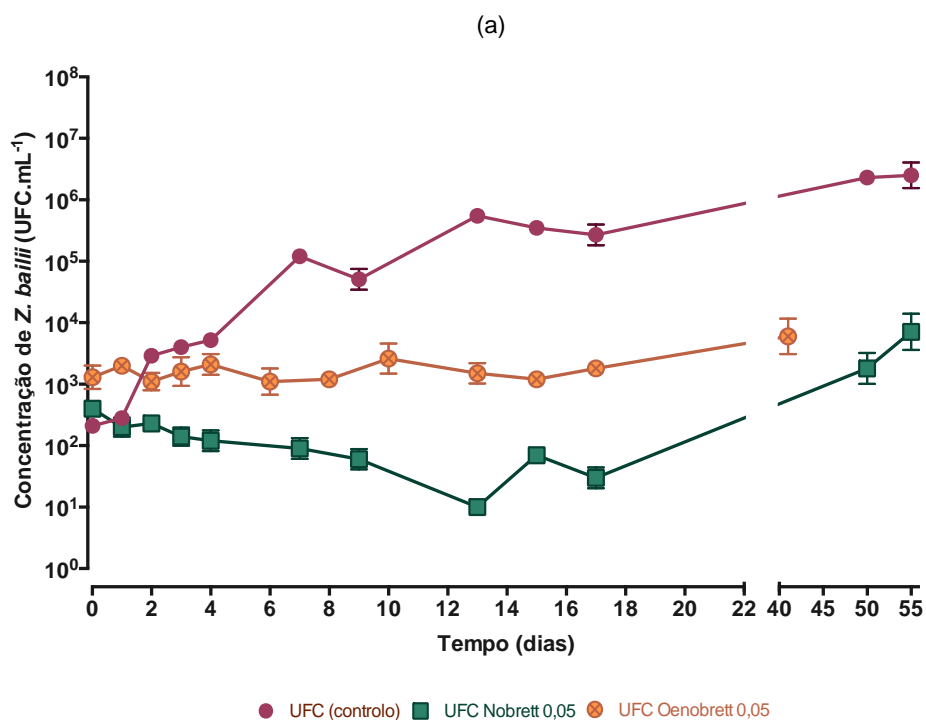


Figura 3.4 Efeito dos dois tipos de quitosano No Brett Inside® e OenoBrett® na concentração de  $0,05 \text{ g.L}^{-1}$  na viabilidade de *Z. bailii*.

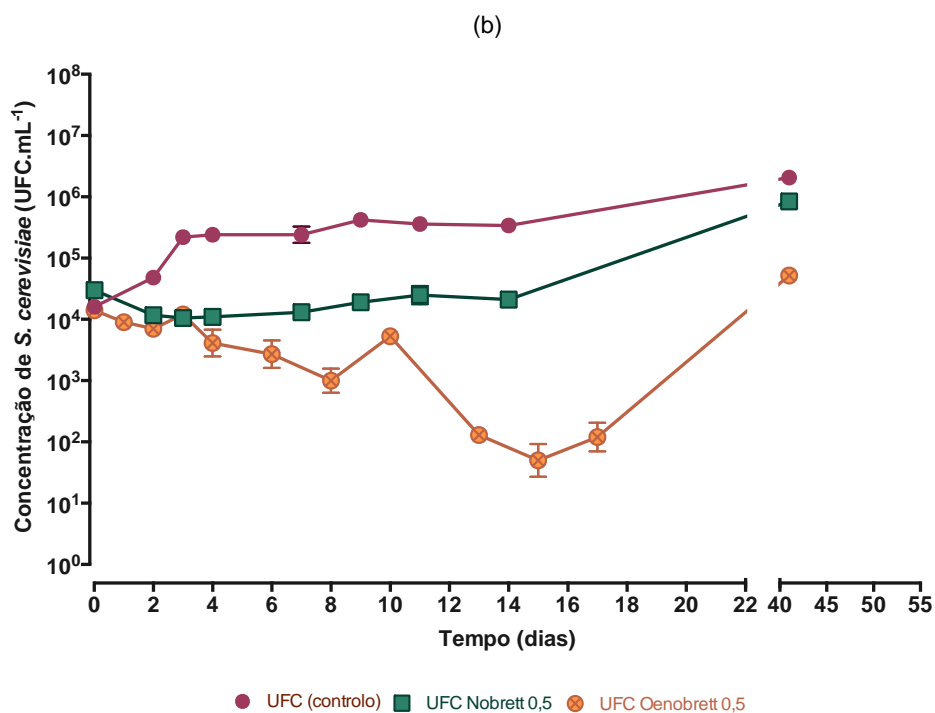


Figura 3.5 Efeito dos dois tipos de quitosano No Brett Inside® e OenoBrett® na concentração de 0,5 g.L<sup>-1</sup> na viabilidade de *S. cerevisiae*.

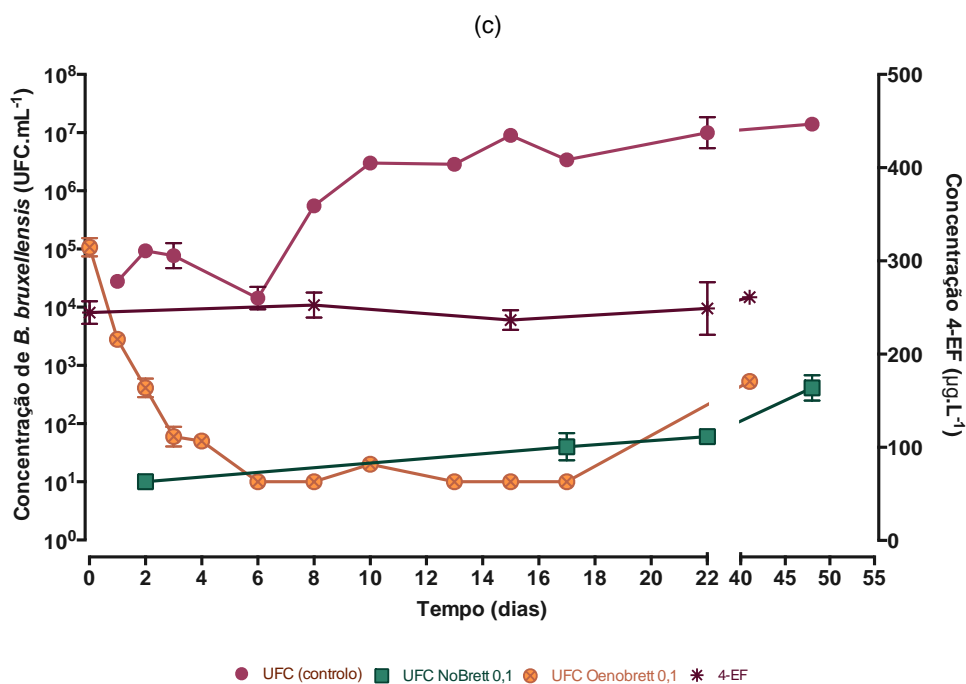


Figura 3.6 Efeito dos dois tipos de quitosano No Brett Inside® e OenoBrett® na concentração de 0,1 g.L<sup>-1</sup> na viabilidade de *B. bruxellensis* e na produção de 4-etilfenol.



## 4. Conclusão

O impacto dos microrganismos na produção, qualidade e segurança do vinho está diretamente ligado com a sua atividade metabólica. Os crescentes problemas da contaminação microbiana do vinho têm dado origem a novas pesquisas sobre estes tipos de microrganismos. De forma a evitar sabores e aromas indesejáveis, bem como a produção de gás e a turvação neste produto, têm vindo a ser utilizadas diversas estratégias de prevenção. Estas estratégias consistem nomeadamente, na utilização de SO<sub>2</sub>, DMDC, ácido ascórbico, lisozima e quitosano. Este último representa uma potencial alternativa aos métodos tradicionais utilizados no controlo do desenvolvimento e do crescimento das leveduras de alteração do vinho, tratando-se de um produto biodegradável, não tóxico e com elevadas propriedades antimicrobianas. O quitosano utilizado no processo de vinificação é de origem fúngica, isolado de *Aspergillus niger*. Até ao momento, os estudos existentes provam a sua eficácia inibidora nas espécies *B. bruxellensis* e *Z. bailii* (Zuehlke *et al.*, 2013).

Neste trabalho foram testadas várias concentrações de quitosano em três espécies de leveduras de alteração do vinho: *B. bruxellensis*, *S. cerevisiae* e *Z. bailii*. Foram observadas concentrações mínimas letais de quitosano No Brett Inside® para as espécies *Z. bailii* e *B. bruxellensis* de 0,1 e 0,5 g.L<sup>-1</sup>, respetivamente, esta última superior ao limite legal (0,1 g.L<sup>-1</sup>). Para a espécie *S. cerevisiae* verificou-se serem também necessárias concentrações muito superiores ao limite legal (superior a 1 g.L<sup>-1</sup>) para inibir o crescimento desta levedura. Por outro lado, foram testadas as concentrações de 0,05; 0,1 e 0,5 g.L<sup>-1</sup> do quitosano OenoBrett®, para as leveduras *Z. bailii*, *B. bruxellensis* e *S. cerevisiae*, respetivamente. Nestas concentrações todas as espécies mostraram resistência ao efeito deste quitosano, o que implica que as concentrações mínimas letais são superiores às concentrações testadas.

Em conclusão, este trabalho permitiu demonstrar que a eficácia do quitosano nas concentrações legalmente permitidas é dependente da espécie de levedura e do tipo de produto utilizado. Desta forma, a sua utilização a nível de adega deve ser acompanhado por análises microbiológicas que confirmem a sua eficácia.

Como trabalho futuro seria importante testar os dois tipos de quitosano em diferentes vinhos para avaliar o efeito da matriz vinho. Seria significativo também a utilização de várias estirpes da mesma espécie, bem como a realização de ensaios com outras espécies de alteração, como *Saccharomyces ludwigii* e *Schizosaccharomyces pombe*.

## 5. Referências Bibliográficas

- Aranda, A., Matallana, E., Olmo, M., 2005. Levaduras. *Saccharomyces* I. Levaduras de primera fermentación, em: Microbiologia del vino. A. Madrid Vicente Ediciones, Madrid, pp. 19–50.
- Bardi, L., 2005. Fattori che condizionano lo sviluppo dei lieviti nella vinificazione, em: Microbiologia del vino. Casa Editrice Ambrosiana, Milano, pp. 133–157.
- Bauer, R., Dicks, L.M.T., 2004. Control of malolactic fermentation in wine. A review. South African Journal of Enology and Viticulture 25, 74–88.
- C. Fugelsang, K., G. Edwards, C., 2007. Yeasts, em: Wine Microbiology - Practical Applications and Procedures. Springer, New York, pp. 3–28.
- Carson, C.F., Hammer, K.A., Riley, T. V., 1995. Broth microdilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Microbios 82, 181–185.
- Chatonnet, P., Dubourdie, D., Boidron, J., Pons, M., 1992. The origin of ethylphenols in wines. Journal of Science of Food and Agriculture 60, 165–178.
- Christaki, T., Tzia, C., 2002. Quality and safety assurance in winemaking. Food Control 13, 503–517.
- Ciani, M., Ferraro, L., 1997a. Role of Oxygen on Acetic Acid Production by *Brettanomyces/Dekkera* in Winemaking. Journal of Science of Food and Agriculture 75, 489–495.
- Cocolin, L., Ercolini, D., 2008. Wine Fermentation, em: Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods. Springer, New York, pp. 162–192.
- Cocolin, L., Mills, D.A., 2003. Wine yeast inhibition by sulfur dioxide: A comparison of culture-dependent and independent methods. American Journal of Enology and Viticulture 54, 125–130.
- Comi, G., Manzano, M., Cocolin, L., 2005. Le alterazioni microbiche dei vini, em: Microbiologia del vino. Casa Editrice Ambrosiana, Milano, pp. 315–345.
- Costa, A., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2008. Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. Food Microbiology, 25, 422–427.
- Cuero, R.G., Osuji, G., Washington, A., 1991. N-carboxymethylchitosan inhibition of aflatoxin production: Role of zinc. Biotechnology Letters 13, 441–444.
- Deak, T., Beuchat, L.R., 1996. Growth and Survival, em: Handbook of Food Spoilage Yeasts. CRC Press, Florida, pp. 45–59.
- Delanoe, D., Nathalie, S., Abasq, P., Bertrand, P., Letard, S., Simon, F., 2005. Différents types de désordres observés dans les boissons, em: Troubles et Dépôts des Boissons Fermentées et des Jus de Fruits - Aspects Pratiques du Diagnostic. OENOPLURIMÉDIA, pp. 13–35.

Delfini, C., Gaia, P., Schellino, R., Strano, M., Pagliara, A., Ambrò, S., 2002. Fermentability of grape must after inhibition with dimethyl dicarbonate (DMDC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 5605–5611.

Dequin, S., Salmon, J.-M., Nguyen, H.-V., Blodin, B., 2003. Wine yeasts, em: Yeasts in Food. B. Behr's Verlag, Hamburg, pp. 389–425.

De Rosa, T., G. Margheri, I. Moret, G. Scarponi, G. Versini, 1983. Sorbic acid as a preservative in sparkling wine. Its efficacy and adverse flavor effect associated with ethyl sorbate formation. *American Journal of Enology and Viticulture* 34, 98–102.

Devlieghere, F., Vermeulen, A., Debevere, J., 2004. Chitosan: Antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology* 21, 703–714.

Divol, B., Strehaiano, P., Lonvaud-Funel, A., 2005. Effectiveness of dimethyldicarbonate to stop alcoholic fermentation in wine. *Food Microbiology* 22, 169–178.

Drici-Cachon, Z., Guzzo, J., Cavin, J.-F., Diviès, C., 1996. Acid tolerance in *Leuconoctoc oenos*. Isolation and characterization of an acid-resistant mutant. *Springer-Verlag* 44, 785–789.

Du Toit, W.J., Pretorius, I.S., Lonvaud-Funel, A., 2005. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology* 98, 862–871.

Dutta, P.K., Tripathi, S., Mehrotra, G.K., Dutta, J., 2009. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry* 114, 1173–1182

E. Kunkee, R., F. Bisson, L., 1993. Wine-making Yeasts, em: The Yeasts. Academic Press Limited, London, pp. 69–118.

Egli, C.M., Henick-kling, T., 2001. Identification of *Brettanomyces/Dekkera* Species Based on Polymorphism in the rRNA Internal Transcribed Spacer Region. *American Journal of Enology and Viticulture* 52, 241–247.

Emmerich, W., Radler, F., 1983. The Anaerobic Metabolism of Glucose and Fructose by *Saccharomyces bailii*. *Microbiology* 129, 3311–3318.

Enrique, M., Marcos, J.F., Yuste, M., Martínez, M., Vallés, S., Manzanares, P., 2007. Antimicrobial action of synthetic peptides towards wine spoilage yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 118, 318–325.

Finlay, J., Miller, L., Poupard, J.A., 2003. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 52, 18–23.

Fleet, G.H., 2003. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86, 11–22.

Fleet, G.H., 2006. The Commercial and Community Significance of Yeasts in Food and Beverage Production, em: Yeasts in Food and Beverages. Springer, Germany, pp. 1–12.

Fleet, G.H., Heard, G.M., 1993. Yeasts - Growth During Fermentation, em: Wine Microbiology and Biotechnology. Taylor and Francis, London, pp. 27–47.

Fugelsang, K.C., Edwards, C.G., 2007a. Managing Microbial Growth, em: Wine Microbiology - Practical Applications and Procedures. Springer, New York, pp. 65–75.

Fugelsang, K.C., Edwards, C.G., 2007b. Fermentation and Post-Fermentation Processing, em: Wine Microbiology - Practical Applications and Procedures. Springer, New York, pp. 115–151.

Fugelsang, K.C., Edwards, C.G., 2007c. Lactic Acid Bacteria, em: Wine Microbiology - Practical Applications and Procedures. Springer, New York, pp. 29–41.

Fugelsang, K.C., Edwards, C.G., 2007d. Microbial Ecology During Vinification, em: Wine Microbiology - Practical Applications and Procedures. Springer, New York, pp. 82–100.

Fugelsang, K.C., Edwards, C.G., 2007e. Wine Spoilage, em: Wine Microbiology - Practical Applications and Procedures. Springer, New York, pp. 162–179.

Genisheva, Z., Mota, A., Mussatto, S.I., Oliveira, J.M., Teixeira, J. a., 2014. Integrated continuous winemaking process involving sequential alcoholic and malolactic fermentations with immobilized cells. Process Biochemistry 49, 1–9.

Gómez-Rivas, L., Escudero-Abarca, B.I., Aguilar-Uscanga, M.G., Hayward-Jones, P.M., Mendoza, P., Ramírez, M., 2004. Selective antimicrobial action of chitosan against spoilage yeasts in mixed culture fermentations. Journal of Industrial Microbiology Biotechnology 31, 16–22.

Goy, R.C., Britto, D. de, Assis, O.B.G., 2009. A review of the antimicrobial activity of chitosan. Polímeros: Ciência e Tecnologia 19, 1–7.

Grbin, P.R., Henschke, P. a, 2000. Mousy off-flavour production in grape juice and wine by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeasts. Australian Journal of Grape and Wine Research 6, 255–262.

Guibal, E., 2004. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: A review. Separation and Purification Technology 38, 43–74.

Henick-Kling, T., Edinger, W., Daniel, P., Monk, P., 1998. Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. Journal of Applied Microbiology 84, 865–876.

Heresztyn, T., 1986. Metabolism of volatile phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeast. Archives of Microbiology 146, 96–98.

Hulin, M., Wheals, A., 2014. Rapid identification of *Zygosaccharomyces* with genus-specific primers. International Journal of Food Microbiology 173, 9–13.

Kheir, J., Salameh, D., Strehaiano, P., Brandam, C., Lteif, R., 2013. Impact of volatile phenols and their precursors on wine quality and control measures of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts. European Food Research and Technology 237, 1–17.

Kong, M., Chen, X.G., Xing, K., Park, H.J., 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology* 144, 51–63.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W., 1998. Classification of yeasts, em: *The Yeasts*. Elsevier B.V., Amsterdam, pp. 1–3.

Lafon-Lafourcade, S., Carre, E., Ribéreau-Gayon, P., 1983. Occurrence of Lactic Acid Bacteria During the Different Stages of Vinification and Conservation of Wines. *Applied and Environmental Microbiology* 46, 874–880.

Lambert, R.J., Pearson, J., 2000. Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *Journal of Applied Microbiology* 88, 784–790.

Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J., Nychas, G.J.E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 91, 453–462.

Lerm, E., Engelbrecht, L., du Toit, M., 2010. Malolactic fermentation: The ABC's of MLF. *South African Journal of Enology and Viticulture* 31, 186–212.

Lewis, J.G., Northcott, C.J., Learmonth, R.P., Watson, K., 1993. The need for consistent nomenclature and assessment of growth phases in diauxic cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology* 139, 835–839.

Lonvaud-Funel, A., 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 317–331.

Lonvaud-Funel, A., Renouf, V., Strehaiano, P., 2010a. Les altérations microbiologiques des vins, em: *Microbiologie du vin - Bases fondamentales et applications*. Lavoisier, Paris, pp. 176–215.

Lonvaud-Funel, A., Renouf, V., Strehaiano, P., 2010b. Les traitements pour la maîtrise des micro-organismes et la stabilité microbiologique des vins, em: *Microbiologie du vin - Bases fondamentales et applications*. Lavoisier, Paris, pp. 267–301.

Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M., 1993. Yeasts in food spoilage, em: *Encyclopedia of food science technology and nutrition*. Academic Press Limited, London, pp. 4344–4349.

Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M., 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology* 86, 23–50.

Loureiro, V., Querol, A., 1999. The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Trends in Food Science and Technology* 10, 356–365

Manzanares, P., Vallés, S., 2005. Levaduras. No *Saccharomyces*, em: *Microbiología del vino*. A. Madrid Vicente, Ediciones, Madrid, pp. 114–142.

Martini, A., 2005. Ecofisiologia dei lieviti vinari, em: *Microbiologia del vino*. Casa Editrice Ambrosiana, Milano, pp. 63–80.

- Másson, M., Holappa, J., Hjálmarsdóttir, M., Rúnarsson, Ö. V., Nevalainen, T., Järvinen, T., 2008. Antimicrobial activity of piperazine derivatives of chitosan. *Carbohydrate Polymers* 74, 566–571.
- Mitrakul, C.M., Henick-Kling, T., Egli, C.M., 1999. Discrimination of *Brettanomyces*/Dekkera yeast isolates from wine by using various DNA finger- printing methods. *Food Microbiology* 16, 3–14.
- Mohanasrinivasan, V., Mishra, M., Paliwal, J.S., Singh, S.K., Selvarajan, E., Suganthi, V., Subathra Devi, C., 2013. Studies on heavy metal removal efficiency and antibacterial activity of chitosan prepared from shrimp shell waste. *3 Biotech* 4, 167–175.
- Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C., Jorganes, F., Muñoz, R., 2003. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology* 84, 117–123.
- Muñoz, R., Moreno-Arribas, M.V., Rivas, B. de las, 2005. Bacterias lácticas, em: *Microbiología del vino*. A. Madrid Vicente, Ediciones, Madrid, pp. 231–264.
- Nardi, T., Vagnoli, P., Minacci, A., Gautier, S., Sieczkowski, N., 2014. Evaluating the impact of a fungal-origin chitosan preparation on *Brettanomyces bruxellensis* in the context of wine aging. *Wine Studies* 3, 13–15.
- Ohtakara, A., Izume, M., Mitsutomi, M., 1988. Action of microbial chitinases on chitosan with different degrees of deacetylation. *Agricultural Biological Chemistry* 52, 3181–3182.
- Ough, C. S., Ingraham, J. L., 1960. Use of sorbic acid and sulfur dioxide in sweet table wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 11, 117–122.
- Peterson, T.W., Ough, C.S., 1979. Dimethyldicarbonate reaction with higher alcohols. *American Journal of Enology and Viticulture* 30, 119–123.
- Pillai, C.K.S., Paul, W., Sharma, C.P., 2009. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science* 34, 641–678.
- Pillet, O., 2010. Chitosan and *Brettanomyces*: Origin, Impact and Mode of Action.
- Portugal, C., Sáenz, Y., Rojo-Bezares, B., Zarazaga, M., Torres, C., Cacho, J., Ruiz-Larrea, F., 2013. *Brettanomyces* susceptibility to antimicrobial agents used in winemaking: in vitro and practical approaches. *European Food Research and Technology*, 1–12.
- Raafat, D., Von Bargen, K., Haas, A., Sahl, H.G., 2008. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 3764–3773.
- Rabea, E.I., Badawy, M.E.T., Stevens, C. V., Smagghe, G., Steurbaut, W., 2003. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules* 4, 1457–1465.
- Rainieri, S., Zambonelli, C., Kaneko, Y., 2003. *Saccharomyces sensu stricto*: systematics, genetic diversity and evolution. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 96, 1–9.



Renee Terrell, F., J. R. Morris, M. G. Johnson, E. E. Gbur, D. J. Makus, 1993. Yeast inhibition in grape juice containing sulfur dioxide, sorbic acid and dimethyldicarbonate. *Journal of Food Science* 58, 1132–1134.

Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2007. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75, 149–164.

Renouf, V., Lonvaud-Funel, A., 2007. Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. *Microbiology Research* 162, 154–167.

Renouf, V., Strehaiano, P., Lonvaud-Funel, A., 2008. Effectiveness of dimethyldicarbonate to prevent *Brettanomyces bruxellensis* growth in wine. *Food Control* 19, 208–216.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A., 2006. Lactic Acid Bacteria, em: *Handbook of Enology - The Microbiology of Wine and Vinifications*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 115–159.

Rodas, A.M., Ferrer, S., Pardo, I., 2003. 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Systematic and Applied Microbiology* 26, 412–422.

Rodriguez, S.B., Thornton, M. a., Thornton, R.J., 2013. Raman spectroscopy and chemometrics for identification and strain discrimination of the wine spoilage yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, and *Brettanomyces bruxellensis*. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 6264–6270.

Roller, S., Covill, N., 1999. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology* 47, 67–77.

Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A., 2003. Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86, 169–180.

Sablayrolles, J.M., 2009. Control of alcoholic fermentation in winemaking: Current situation and prospect. *Food Research International* 42, 418–424.

Shahidi, F., Arachchi, J.K.V., Jeon, Y.J., 1999. Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science and Technology* 10, 37–51.

Shalaby, A.R., 1997. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International* 29, 675–690.

Smith, M., 2011. *Bretanomyces* Kufferath & van Laer 1921, em: *The Yeasts - A Taxonomic Study*. Elsevier Science Publisher, pp. 983–986.

Sponholz, W.-R., 1993. Wine Spoilage by Microorganisms, em: *Wine Microbiology and Biotechnology*. Hardwood Academic Publishers, Switzerland, pp. 395–420.

Stafford, P.A., Ough, C.S., 1976. Formation of methanol and ethyl methyl carbonate by dimethyl dicarbonate in wine and model solutions. *American Journal of Enology and Viticulture* 26, 130–133.

Stratford, M., A. James, S., 2003. Non-alcoholic beverages and yeasts, em: Yeasts in Food - Beneficial and Detrimental Aspects. B. Behr's Verlag, Hamburg, pp. 309–333.

Suárez, R., Suárez-Lepe, J. a., Morata, a., Calderón, F., 2007. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. Food Chemistry 102, 10–21.

Sudarshan, N.R., Hoover, D.G., Knorr, D., 1992. Antibacterial action of chitosan. Food Biotechnology 6, 257–272.

Taillandier, P., Joannis-Cassan, C., Jentzer, J.-B., Gautier, S., Sieczkowski, N., Granes, D., Brandam, C., 2015. Effect of a fungal chitosan preparation on *Brettanomyces bruxellensis*, a wine contaminant. Journal of Applied Microbiology 118, 123–131.

Toit, M., Pretorius, I.S., 2000. Microbial Spoilage and Preservation of Wine : Using Weapons from Nature's Own Arsenal - A Review. South African Journal of Enology and Viticulture 21, 74–96.

Tokura, S., Ueno, K., Miyazaki, S., Nishi, N., 1996. Molecular Weight Dependent Antimicrobial Activity Chitosan, em: New Macromolecular Architecture and Functions. Springer, Osaka, pp. 199–207.

Torija, M.J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Mas, A., 2001. Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. Antonie van Leeuwenhoek 79, 345–352.

Uthurry, C. a., Suárez Lepe, J. a., Lombardero, J., García Del Hierro, J.R., 2006. Ethyl carbamate production by selected yeasts and lactic acid bacteria in red wine. Food Chemistry 94, 262–270.

Vaughan-Martini, A., Martini, A., 1998. *Saccharomyces Meyen ex Rees*, em: The Yeasts - A Taxonomic Study. Elsevier Science Publisher, p. 358.

Versari, a, Parpinello, G.P., Cattaneo, M., 1999. *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: a review. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 23, 447–455.

Vicenzini, M., Romano, P., Farris, G.A., 2005. Appendice 2 - Breve descrizione dei generi più frequentemente riscontrati in vinificazione, em: Microbiologia del vino. Casa Editrice Ambrosiana, Milano, p. 484490.

Warth, A. D., 1985. Resistance of yeasts species to benzoic and sorbic acids and to sulfur dioxide. Journal of Food Protection 48, 564–569.

Zakrzewska, A., Boorsma, A., Brul, S., Klaas, J., Klis, F.M., Hellingwerf, K.J., 2005. Transcriptional Response of *Saccharomyces cerevisiae* to the Plasma Membrane-Perturbing Compound Chitosan. Eukaryotic Cell 4, 703–715.

Zheng, L.Y., Zhu, J.F., 2003. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. Carbohydrate Polymers 54, 527–530.

Zuehlke, J.M., Petrova, B., Edwards, C.G., 2013. Advances in the control of wine spoilage by *Zygosaccharomyces* and *Dekkera/Brettanomyces*. Annual Review of Food Science and Technology 4, 57–78.